



Développement d'un nouveau biocapteur enzymatique ultrasensible pour la détection conductimétrique de l'ochratoxine A dans l'huile d'olive

Fatma Dridi

► To cite this version:

Fatma Dridi. Développement d'un nouveau biocapteur enzymatique ultrasensible pour la détection conductimétrique de l'ochratoxine A dans l'huile d'olive. Ingénierie des aliments. Université de Lyon; Université de Carthage (Tunisie), 2016. Français. NNT : 2016LYSE1018 . tel-01362941

HAL Id: tel-01362941

<https://theses.hal.science/tel-01362941>

Submitted on 9 Sep 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THESE EN CO-TUTELLE

Entre

UNIVERSITE DE CARTHAGE

&

UNIVERSITE CLAUDE
BERNARD LYON 1

Présentée et soutenue publiquement le 5 Février 2016

Par

Fatma DRIDI

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'université de Carthage et de l'Université Claude Bernard Lyon1

Titre

***Développement d'un nouveau biocapteur enzymatique
ultrasensible pour la détection conductimétrique de
l'ochratoxine A dans l'huile d'olive***

Membres de jury :

Mme KORRI-YOUSSOUFI Hafsa	Rapporteur	Directrice de recherche CNRS, Orsay
M. RAOUAFI Noureddine	Rapporteur	Maître de conférences, Université de Tunis El-Manar, Tunis
M. LEONARD Didier	Examineur	Professeur, Université Claude Bernard, Lyon
Mme MARRAKCHI Mouna	Examineur	Maître Assistante, Université de Tunis El-Manar, Tunis
Mme LAGARDE Florence	Directeur de thèse	Chargée de recherche CNRS, Lyon
M. GARGOURI Mohamed	Directeur de thèse	Professeur, Université de Carthage, Tunis

Membres invités :

Mme SAULNIER Joelle, Maître de conférences, Université Claude Bernard, Lyon

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

Vice-président du Conseil Scientifique

Directeur Général des Services

M. François-Noël GILLY

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Philippe LALLE

M. le Professeur Germain GILLET

M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Faculté d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Directeur : Mme. la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Polytech Lyon

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur : M. F. DE MARCHI

Directeur : M. le Professeur F. FLEURY

Directeur : Mme Caroline FELIX

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Directeur : M. le Professeur Georges TOMANOV

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : M. Jean-Claude PLENET

Directeur : M. Y. VANPOULLE

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Directeur : M. le Professeur E. PERRIN

Directeur : M. G. PIGNAULT

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1
Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education
Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Directeur : M. le Professeur A.
MOUGNIOTTE

Directeur : M. N. LEBOISNE

*A ceux qui sont de plus chers dans ma vie, ceux qui ont toujours
été là pour moi, à mes parents Touhemi et Zakia Je dédie ce
modeste travail.*

REMERCIEMENTS

Bien que ces quelques pages introduisent ce manuscrit, elles signent pour moi la fin de sa rédaction et la fin d'une aventure que j'ai débutée il y a quatre ans.

Cette thèse de Doctorat a été réalisée dans le cadre d'une convention de cotutelle entre l'université Claude Bernard Lyon1 et l'université de Tunis Carthage. Les travaux présentés dans ce manuscrit ont été majoritairement réalisés au sein de l'Institut des Sciences Analytiques de Lyon.

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail de thèse.

*Je tiens tout d'abord à exprimer mes plus vifs remerciements à mes directeurs de thèse **Mme Florance LAGARDE** et **M. Mohamed GARGOURI** pour la confiance qu'ils ont placée en moi en assurant la direction de cette thèse.*

*J'adresse également mes remerciements aux Mmes **Joëlle SAULNIER**, **Mouna MARRAKCHI** et **Nicole JAFFREZIC-RENAULT** pour leur gentillesse et leur support dans l'accomplissement de ce travail.*

*Mes remerciements s'adressent également aux membres du Jury, aux rapporteurs et aux examinateurs pour le temps accordé à la lecture de ces travaux et leurs remarques constructives qu'ils ont émises à son enrichissement. Merci à **Mme Hafsa KORRI-YOUSSOUFI**, **M. Didier LEONARD** et **M. Nouredine RAOUAFI**.*

*J'exprime ma profonde gratitude envers mes collègues et tous les membres de l'équipe **SIMS** (Surfaces (bio)-Interfaces Micro/nano Systèmes) de l'Institut des Sciences Analytiques (ISA) pour leur sympathie et l'ambiance cordiale qu'ils ont su faire régner au sein de l'équipe.*

*Enfin un remerciement très particulier à ceux qui m'ont donné le courage pour surmonter les moments difficiles durant cette thèse, à **ma famille**.*

Résumé :

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés au développement d'un nouveau biocapteur enzymatique ultrasensible pour la détection conductimétrique d'une mycotoxine, l'ochratoxine A (OTA). Une peptidase, la thermolysine (TLN), a été choisie comme élément de reconnaissance. Le biocapteur proposé est basé sur l'immobilisation de la TLN dans une matrice d'alcool polyvinylique (PVA)/polyéthylèneimine (PEI) contenant des nanoparticules d'or et réticulée à la surface de microélectrodes interdigitées à l'aide de vapeurs de glutaraldéhyde. Dans les conditions optimales (35 min de réticulation, mesure à pH 7 et 25°C), la réponse du biocapteur est linéaire jusqu'à 60 nM et la limite de détection est de 1 nM. Cette valeur est 700 fois plus basse que celle obtenue en utilisant une méthode d'immobilisation basée sur la co-réticulation de la TLN en présence d'albumine de sérum bovin (BSA). La matrice PVA/PEI crée un environnement aqueux favorable à l'enzyme. Par ailleurs, les interactions entre les groupements amines protonés du PEI et les charges négatives des nanoparticules citratées et de la TLN améliore leur dispersion dans la matrice et favorise la stabilisation de l'enzyme et son accessibilité au substrat (OTA). Le biocapteur conductimétrique développé est très reproductible et stable pendant 30 jours lorsqu'il est stocké à 4°C dans du tampon phosphate 20 mM pH7 entre 2 mesures. Le biocapteur a ensuite été évalué sur des échantillons d'huile d'olive commerciale dopée. Aucun prétraitement de l'échantillon n'a été nécessaire et des taux de recouvrement proches de 100% ont été obtenus, démontrant l'absence d'effet de matrice.

Mots clés : **biocapteur, ochratoxine A, conductimétrie, thermolysine, alcool polyvinylique, polyéthylèneimine, nanoparticules d'or, huile d'olive.**

Abstract:

A new ultrasensitive enzymatic biosensor for the direct conductometric detection of ochratoxin A (OTA) has been developed in this work. Thermolysin (TLN), a peptidase, was chosen as recognition element. The proposed biosensor is based on TLN immobilization into a polyvinyl alcohol (PVA)/polyethylenimine (PEI) matrix containing gold nanoparticles (AuNPs) and cross-linked at the surface of gold interdigitated microelectrodes using glutaraldehyde vapor. Under optimal conditions (35 min cross-linking time, working pH of 7 and temperature of 25°C), the biosensor response was linear up to 60 nM OTA and the limit of detection was 1 nM. This value was 700 times lower than the detection limit obtained using the more classical method based on enzyme cross-linking in the presence of bovine serum albumin (BSA). PVA/PEI hydrogel creates a very favorable aqueous environment for the enzyme. In addition, interactions between protonated amino groups of PEI and negative charges of both citrated AuNPs and thermolysin improve their dispersion in the polymer blend, favoring enzyme stabilization and accessibility to the substrate (OTA). The developed OTA biosensor was very reproducible and stable over a 30 days period when stored at 4°C in

20 mM phosphate buffer between two measurements. The method was further evaluated using commercial doped olive oil samples. No pretreatment of the sample was needed for testing and no matrix effect was observed. Recovery values were close to 100%, demonstrating the suitability of the proposed method for OTA screening in olive oil.

Keywords: biosensor, ochratoxin A, conductometry, thermolysin, polyvinyl alcohol, polyethylenimine, gold nanoparticles, olive oil.

SOMMAIRE

Introduction générale	1
Chapitre I : Etude bibliographique	4
I.1. Les biocapteurs	4
I.1.1. Définition et conception	4
I.1.2. Les éléments de reconnaissance	5
I.1.2.1. Biorécepteurs d'affinité	6
I.1.2.2. Biorécepteurs métaboliques	8
I.1.2.3. Les récepteurs biomimétiques	9
I.1.3. Les modes de transduction	10
I.1.3.1. Transduction optique	10
I.1.3.2. Transduction mécanique	10
I.1.3.3. Transduction thermique	11
I.1.3.4. Transduction électrochimique	11
I.1.3.5. Les transducteurs électrochimiques	18
I.1.4. Les méthodes d'immobilisation	20
I.1.4.1. Adsorption	20
I.1.4.2. Liaison covalente	21
I.1.4.3. Réticulation et co-réticulation	21
I.1.4.4. Piégeage dans des matrices polymériques	23
I.2. L'ochratoxine A	29
I.2.1. Généralités sur les mycotoxines	29
I.2.2. Description de l'ochratoxine A	30
I.2.2.1. Structure et dérivés	30
I.2.2.2. Propriétés physico-chimiques	31
I.2.3. Impacts sur l'homme	31
I.2.3.1. Données toxicologiques	31
I.2.3.2. Contamination alimentaire	33
I.2.3.3. Pertes économiques	34
I.2.4. Réglementation et législation	35
I.2.5. Méthodes de détoxification	36
I.2.6. Méthodes d'analyse de l'OTA	38
I.2.6.1. Méthodes chromatographiques	38
I.2.6.2. Méthodes immunochimiques	39
I.2.6.3. Biocapteurs	40
I.3. Les peptidases	41
I.3.1. Généralités sur les enzymes	41
I.3.1.1. Classification	41
I.3.1.2. Site actif	42
I.3.1.3. Mécanismes de catalyse	42
I.3.1.4. Cinétique enzymatique	43
I.3.2. Les peptidases	49
I.3.2.1. Généralités	49
I.3.2.2. La thermolysine	50
I.3.2.3. La carboxypeptidase Y	52
Références	54
Chapitre II : Matériel et méthodes	65
II.1. Réactifs et préparation des solutions	65
II.1.1. Réactifs	65
II.1.2. Préparation des solutions	65

II.2. Synthèse des nanoparticules d'or.....	66
II.3. Transducteurs.....	67
II.3.1. Electrodes d'or interdigitées.....	67
II.3.1.1. Description.....	67
II.3.1.2. Nettoyage et test des transducteurs nus.....	68
II.3.1.3. Immobilisation des enzymes.....	68
II.3.2. Electrodes d'or carrées.....	70
II.3.2.1. Description	70
II.3.2.2. Nettoyage et test des transducteurs nus.....	70
II.3.3.3. Immobilisation des enzymes.....	70
II.4. Méthodes de caractérisation microscopique.....	71
II.4.1. Microscopie électronique en transmission (TEM)	71
II.4.2. Microscopie à force atomique (AFM)	72
II.5. Mesures électrochimiques.....	73
II.5.1. Conductimétrie.....	73
II.5.2. Impédancemétrie et voltampérométrie cyclique.....	75
II.6. Application à des échantillons réels.....	77
II.6.1. Analyse de l'OTA par le biocapteur conductimétrique.....	77
II. 6.2. Evaluation de l'Extraction de l'OTA à partir de l'huile d'olive.....	78
II.6.2.1. Préparation de la gamme d'étalonnage pour l'analyse de l'OTA par ELISA	78
II.6.2.2. Extraction de l'OTA à partir de l'huile d'olive	78
II.6.2.3. Préparation des échantillons d'huile	78
Références	80
Chapitre III : Résultats et discussion	81
III.1. Choix de l'élément de reconnaissance	81
III.1.1. Optimisation du signal des biocapteurs.....	81
III.1.1.1. Temps de réticulation.....	82
III.1.1.2. pH.....	83
III.1.1.3. Température.....	84
III.1.2. Cinétiques enzymatiques.....	85
III.1.3. Caractéristiques analytiques des biocapteurs.....	87
III.1.3.1. Linéarité et sensibilité.....	87
III.1.3.2. Temps de réponse.....	88
III.1.3.3. Reproductibilité intra- et inter biocapteurs à court terme.....	89
III.1.3.4. Stabilité de stockage	89
III.1.4. Détermination de l'OTA dans des échantillons d'huile d'olive.....	90
III.1.5. Conclusion.....	91
III.2. Amélioration de la limite de détection du biocapteur.....	92
III.2.1. Pré-concentration de l'échantillon.....	92
III.2.1.1. Dosage de l'OTA par la méthode ELISA.....	92
III.2.1.2. Taux de recouvrement	93
III.2.2. Evaluation d'une nouvelle méthode d'immobilisation.....	93
III.2.2.1. Caractérisation des biomembranes par imagerie AFM.....	94
III.2.2.2. Caractérisation préliminaire des électrodes fonctionnalisées par CV... ..	95
III.2.2.3. Optimisation de la concentration en AuNPs.....	96
III.2.2.4. Influence de la concentration en OTA sur les propriétés électrochimiques de la biomembrane PVA/PEI/TLN/AuNPs.....	99
III.2.2.5. Performances du biocapteur conductimétrique à base de TLN/(PVA/PEI)/AuNPs pour l'analyse de l'OTA.....	102

III.2.2.5.1. Confirmation des conditions de fabrication et de mesure du biocapteur	102
III.2.2.5.2. Caractéristiques analytiques du biocapteur TLN/ (PVA/PEI)/AuNPs	106
III.2.2.5.3. Application à des échantillons réels d'huile d'olive.....	111
III.2.2.5.4. Comparaison des performances analytiques du biocapteur avec d'autres biocapteurs électrochimiques conçus pour la détection de l'OTA.....	112
III.2.3. Conclusion.....	115
Références.....	116
Conclusion générale	119

Liste des figures

Figure I.1. Représentation schématique du principe de fonctionnement d'un biocapteur	5
Figure I.2. Les différents types de biorécepteurs	6
Figure I.3. Structure schématique d'une molécule d'anticorps	7
Figure I.4. Représentation schématique des récepteurs membranaires	7
Figure I.5. Mécanisme réactionnel d'une réaction enzymatique	8
Figure I.6. Synthèse des polymères à empreinte moléculaire	10
Figure I.7. Principe de la détection conductimétrique	13
Figure I.8. Principe de la détection impédancemétrique.....	14
Figure I.9. Calcul des différents paramètres à partir du diagramme de Nyquist.....	15
Figure I. 10. Programmation du potentiel au cours du temps en voltammétrie cyclique	16
Figure I.11. Représentation typique d'un voltammogramme	17
Figure I.12 : Illustration du procédé de recyclage des espèces redox des électrodes interdigitées	18
Figure I.13. Modèle de circuit équivalent au transducteur conductimétrique à deux électrodes interdigitées	19
Figure I.14. Modèle de circuit simplifié équivalent au transducteur conductimétrique à deux électrodes interdigitées	19
Figure I.15. Immobilisation des biomolécules par adsorption	21
Figure I.16. Immobilisation des biomolécules par liaison covalente	21
Figure I.17. Immobilisation des biomolécules par réticulation et co-réticulation	22
Figure I.18. Réactions des différentes formes de GA avec les enzymes	22
Figure I.19. Immobilisation des biomolécules par piégeage	23
Figure I.20. Polymères utilisés dans l'élaboration de biocapteurs enzymatiques	24
Figure I.21. Formule chimique du PVA	25
Figure I.22. Structure linéaire (a) et ramifiée (b) du PEI	26
Figure I.23. Formule générale des ochratoxines	30
Figure I.24. Répartition des contaminants alimentaires	33
Figure I.25. Principaux pays producteurs d'huile d'olive dans le monde en 2012 ...	34
Figure I.26. Pourcentage de la population mondiale protégée par des réglementations sur les mycotoxines	35
Figure I.27. Relation entre la vitesse et la concentration du substrat	44
Fig I.28. Evolution de la vitesse de la réaction enzymatique en fonction de la concentration en substrat	46
Figure I.29. Influence de la concentration en enzyme sur la cinétique d'apparition du produit	47
Figure I.30. Influence de la concentration en substrat sur la cinétique d'apparition du produit	47
Figure I.31. Effet de pH sur l'activité enzymatique	48
Figure I.32. Effet de la température sur l'activité enzymatique	48
Figure I.33. Structure cristallographique de la thermolysine	51

Figure I.34. Mécanisme catalytique de la thermolysine	51
Figure I.35. Structure cristallographique de la carboxypeptidase Y	51
Figure I.36. Mécanisme catalytique de la carboxypeptidase Y	53
Figure II.1.Principe de la synthèse des nanoparticules d'or par la méthode de Turkevich	67
Figure II.2.Microélectrodes d'or interdigitées photographie (a), représentation schématique (b)	67
Figure II.3. Représentation schématique du principe (i) et de l'architecture des différents biocapteurs : TLN/BSA ou CPY/BSA (ii.a), TLN/(PVA/PEI) (ii.b), TLN/BSA/AuNPs (ii.c) et TLN/(PVA/PEI)/AuNPs (ii.d)	69
Figure II.4. Microélectrode d'or carrée	70
Figure II.5. Microscope électronique en transmission	71
Figure II.6. Schéma du principe d'un microscope à force atomique	72
Figure II.7. Dispositif expérimental de la mesure conductimétrique	73
Figure II.8. Montage utilisé pour la mesure conductimétrique	74
Figure II.9. Modèle de la réponse conductimétrique	75
Figure II.10. Electrodes utilisées pour la mesure	75
Figure II.11. Dispositif utilisé pour les mesures par spectroscopie d'impédance et voltampérométrie cyclique	76
Figure II.12. Illustration des circuits équivalents utilisés : Circuit équivalent pour l'électrode d'or nu (a) pour les électrodes modifiées (b).....	77
Figure III.1.Effet du temps de réticulation sur la réponse des biocapteurs conductimétriques CPY/BSA (■) et TLN/BSA (□)	82
Figure III.2. Effet du pH sur la réponse des biocapteurs conductimétriques CPY/BSA (■) et TLN/BSA (□)	83
Figure III.3. Effet de la température sur la réponse des biocapteurs conductimétriques CPY/BSA (■) et TLN/BSA (□)	84
Figure III.4. Représentations de Lineweaver Burk pour la réaction d'hydrolyse de l'OTA par la TLN et la CPY	85
Figure III.5. Evolution de la vitesse initiale (Vi) en fonction de la concentration en OTA	86
Figure III.6. Evolution de la réponse des biocapteurs en fonction de la concentration d'OTA dans les conditions optimales	88
Figure III.7. Evolution du temps de réponse des biocapteurs en fonction de la concentration en OTA	89
Figure III.8. Stabilité des biocapteurs sur une période de 30 jours de stockage.....	90
Figure III.9. Variation de l'absorbance à 450 nm en fonction de la concentration en OTA	92
Figure III.10. Images TEM des nanoparticules d'or synthétisées	94
Figure III.11. Images AFM (5 µm x 5 µm) de l'électrode en or nue (a), biomembranes TLN/AuNPs/(PVA/PEI) (b) et TLN/BSA (c)	95
Figure III.12. Voltammogrammes cycliques d'un mélange équimolaire de Fe(CN) ₆ ³⁻ /Fe(CN) ₆ ⁴⁻ 5mM dans du tampon PBS 10 mM, pH 7 pour les électrodes d'or nue et modifiées	96

Figure III.13. Spectres d'impédance dans le plan de Nyquist à différentes tensions de polarisation	97
Figure III.14. Diagrammes de Nyquist obtenus pour les mesures d'impédance sur les électrodes nue (►) et modifiée par une biomembrane contenant 10^9 (♦), 10^8 (■), 10^7 (★), 10^6 (●) NPs	98
Figure III.15. Diagrammes d'impédance de l'électrode PVA/PEI/TLN/AuNPs avant et après ajout de différentes concentrations en OTA	99
Figure III.16. Diagrammes d'impédance avant et après ajout de 10^{-12} M d'OTA.....	101
Figure III.17. Variation relative de $\Delta R_p / R_{p0}$ en fonction de la valeur logarithmique de la concentration en OTA en présence et en absence de TLN	102
Figure III.18. Effet du temps d'exposition au GA sur la réponse du biocapteur TLN/AuNPs/(PVA/PEI) après l'injection de 8 nM OTA	103
Figure III.19. Réponse du biocapteur TLN/AuNPs/(PVA/PEI) pour différentes concentrations d'OTA et des temps de réticulation de 25 et 35 min	104
Figure III.20. Comparaison de l'effet du temps de réticulation sur la réponse des biocapteurs	104
Figure III.21. Influence du pH du milieu sur le fonctionnement du biocapteur TLN/AuNPs/(PVA/PEI)	105
Figure III.22. Influence de la température sur le fonctionnement du biocapteur TLN/AuNPs/(PVA/PEI)	106
Figure III.23. Evolution de la réponse de biocapteur TLN / AuNPs / (PVA / PEI) en fonction de la concentration en OTA dans les conditions optimales	107
Figure III.24. Comparaison des réponses des biocapteurs TLN / (PVA / PEI) (▲) et TLN / AuNPs / BSA (■)	107
Figure III.25. Evolution du temps de réponse du biocapteur TLN / AuNPs / (PVA / PEI) en fonction de la concentration en OTA	109
Figure III.26. Evolution de la vitesse initiale V_i en fonction de la concentration en OTA pour le biocapteur TLN / AuNPs / (PVA / PEI)	110
Figure III.27. Etude de la stabilité à long terme du biocapteur TLN/(PVA/PEI)/AuNPs	111

Liste des tableaux

Tableau I.1. Principales moisissures, mycotoxines et denrées susceptibles d'être contaminées	30
Tableau I.2. Désignation des ochratoxines en fonction des différents groupements R1, R2, R3, R4 et R5 de la Fig.I.1	31
Tableau I.3. Teneurs maximales en OTA dans quelques denrées alimentaires destinées à l'Homme, selon le règlement 466/2001/CE	36
Tableau I.4. Teneurs maximales recommandées en OTA pour les produits destinés à l'alimentation animale, selon la recommandation 2006/576/CE	36
Tableau I.5. Quelques micro-organismes capables de dégrader l'OTA	37
Tableau I.6. Principales enzymes impliquées dans la dégradation de l'OTA	38
Tableau I.7. Nomenclature des enzymes et réactions correspondantes	42
Tableau I.8. Quelques exemples des peptidases	50
Tableau III.1 : Affinité de diverses hydrolases pour l'OTA	87
Tableau III.2. Analyse des échantillons d'huile d'olive dopés avec de l'OTA	91
Tableau III.3 : Rendements d'extraction déterminés sur les échantillons d'huile dopés avec 2 et 20 µg d'OTA	93
Tableau III.4. Valeurs des éléments du circuit équivalent obtenues par modélisation des diagrammes de Nyquist présentés sur la figure.III.15.....	100
Tableau III.5. Analyse des échantillons d'huile d'olive dopés	111
Tableau III.6. Comparaison des performances analytiques du biocapteur proposé avec d'autres biocapteurs électrochimiques récemment rapportés dans la littérature	113

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

La qualité ainsi que la sécurité sanitaire des aliments représentent un enjeu majeur et un défi sociétal croissant au niveau mondial. Les politiques et les mesures appliquées afin de garantir une qualité optimale et l'innocuité des aliments proposés à la consommation humaine et animale s'étendent sur l'ensemble de la chaîne alimentaire, de la production à la consommation et sont régies par des réglementations et des législations le plus souvent internationales.

Les mycotoxines, substances toxiques contaminant les aliments, constituent l'une des menaces majeures de la sécurité sanitaire publique. Il s'agit de molécules de faible masse moléculaire, très stables et difficiles à éliminer. Plusieurs centaines de mycotoxines ont été identifiées mais seule une trentaine posséderait des caractéristiques toxiques préoccupantes. Parmi les plus redoutables figure l'ochratoxine A (OTA). Introduite dans la chaîne alimentaire, l'OTA peut être à l'origine d'effets délétères sur les appareils cardiovasculaire et respiratoire et sur le système nerveux, conséquences d'exposition aiguës ou chroniques. L'OTA est également considéré comme carcinogène, mutagène et immunosuppressive. Ces expressions cliniques variées sont connues sous le terme de mycotoxicoses.

L'établissement d'un plan de surveillance permettant l'analyse et l'évaluation de la contamination en OTA des denrées alimentaires devient de fait une priorité incontournable. Les méthodes d'analyse doivent obéir à certains critères dont le faible coût, la rapidité de réponse, la facilité d'utilisation, l'applicabilité sur site mais bien sûr également la fiabilité. Les techniques analytiques habituellement utilisées pour le dosage de l'OTA, telles que la chromatographie et l'ELISA, sont certes des méthodes sensibles et précises, mais elles sont relativement lourdes à mettre en œuvre, coûteuses et nécessitent du personnel hautement

qualifié. Il existe donc à l'heure actuelle une forte demande pour des méthodes alternatives permettant de répondre à ces critères.

Parmi les dispositifs potentiels figurent les biocapteurs électrochimiques qui associent l'extraordinaire pouvoir de reconnaissance de biomolécules (enzymes, anticorps,...) à la sensibilité et la sélectivité de la transduction électrochimique (ampérométrie, potentiométrie,...). Des progrès énormes ont été réalisés ces dernières années en matière de miniaturisation des transducteurs, permettant d'envisager une réduction importante de la quantité de biomolécules nécessaires à l'élaboration des biocapteurs, mais également leur intégration dans des systèmes compacts multi-détection utilisables sur site.

Dans ce contexte, le travail de thèse présenté dans ce manuscrit visait à apporter une contribution significative à l'amélioration de la surveillance de la contamination de produits alimentaires par les mycotoxines. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés au suivi de la contamination des huiles extraites de plantes oléagineuses par l'OTA. Un nouveau biocapteur électrochimique à base d'enzyme a été développé pour la détection de l'OTA dans l'huile d'olive. Pour ce faire, deux hydrolases ayant des mécanismes catalytiques différents ont été sélectionnées et évaluées comme éléments de reconnaissance du biocapteur. Dans chacun des cas, nous nous sommes intéressés à optimiser différents paramètres de fabrication ou de mesure afin de maximiser les performances des biocapteurs en terme de sélectivité, de limite de détection, de reproductibilité et de stabilité. Nous avons par ailleurs étudié la possibilité d'améliorer la sensibilité de notre dispositif par l'évaluation d'une nouvelle méthode d'immobilisation consistant à piéger l'une de ces deux peptidases dans une matrice polymérique en présence de nanoparticules d'or. La potentialité de l'application de ce biocapteur conductimétrique nouvellement développé à l'analyse d'échantillons réels a été également testée.

Ce manuscrit est organisé en trois chapitres :

❖ Le premier chapitre contient quelques généralités sur les biocapteurs (principe de fonctionnement, méthodes d'immobilisation des biorécepteurs et modes de transduction), sur les mycotoxines et l'OTA en particulier (propriétés physicochimiques, toxicologie, réglementation, méthodes d'analyse) ainsi que sur les enzymes (classification, fonctionnement et mécanismes d'action). Un accent particulier a été mis sur les peptidases, famille d'enzymes à laquelle appartiennent les deux enzymes sélectionnées pour le développement du biocapteur.

❖ Dans le deuxième chapitre, une description détaillée de l'ensemble du matériel et des différentes techniques électrochimiques et microscopiques utilisées, ainsi que les différentes méthodes de préparation et de fonctionnalisation des toutes les électrodes employées au cours de cette étude, est réalisée.

❖ Dans le troisième chapitre, nous avons regroupé l'ensemble des résultats obtenus dans ce travail, en décrivant les différentes étapes qui ont permis d'aboutir à la réalisation du biocapteur allant du choix de l'enzyme jusqu'à l'application de la méthode à l'analyse d'échantillons réels.

Une synthèse des résultats ainsi que les perspectives associées à ce travail sont enfin rassemblées dans la conclusion finale de ce manuscrit.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. Les biocapteurs

L'histoire des biocapteurs a débuté dans les années 1950 grâce à l'élaboration par L. Clark de la première électrode capable de mesurer la concentration en oxygène dissous dans le sang. Le couplage de cette électrode à oxygène à une membrane enzymatique renfermant la glucose oxydase a par la suite permis la détermination de la teneur en glucose dans le sang [1] et dans différentes autres solutions biologiques [2]. A la fin des années 70, Guilbault a créé un dispositif pour doser l'urée dans le sang et l'urine [3]. Depuis ces premières ébauches, les biocapteurs ne cessent de susciter l'intérêt des chercheurs et le progrès accomplis dans ce domaine a permis le développement de dispositifs implantables chez des animaux de laboratoire et même chez des patients [4,5].

I.1.1. Définition et conception

D'après l'IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), un biocapteur est un dispositif intégré capable de fournir des informations spécifiques quantitatives ou semi-quantitatives grâce à un élément de reconnaissance d'origine biologique en contact direct avec un élément de transduction. Le terme biocapteur regroupe ainsi tout dispositif de mesure défini par un couple de ligand biologique connecté à un dispositif de transduction conçu pour transformer un phénomène biochimique en un signal mesurable.

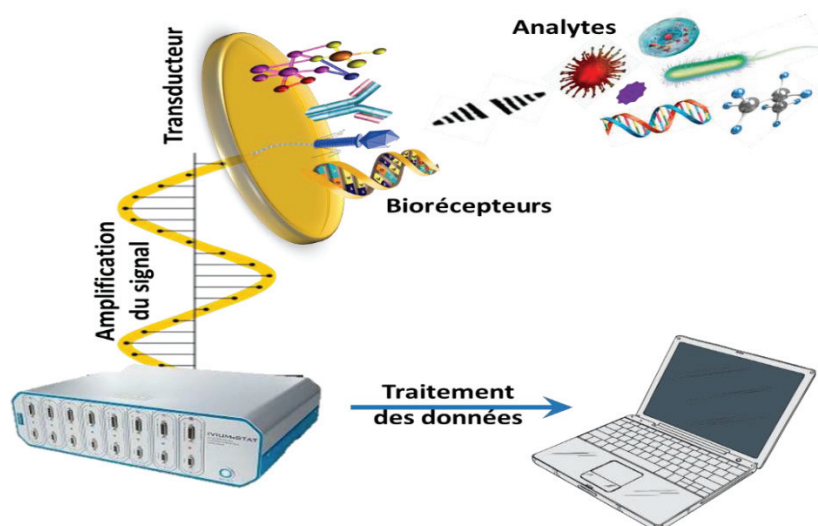


Figure I.1. Représentation schématique du principe de fonctionnement d'un biocapteur

La Fig I.1 présente le principe de fonctionnement d'un biocapteur qui consiste à obtenir à partir de l'espèce à détecter toute information utile à son évaluation. Cette donnée va ensuite être traitée, enregistrée et stockée. Le biorécepteur (enzymes, anticorps, ADN, cellules, organites cellulaires, tissus...) catalyse des réactions biochimiques ou interagit avec des structures complémentaires conduisant à des changements de propriétés physiques ou chimiques convertis en signaux électriques mesurables grâce au transducteur. Ces signaux seront ensuite amplifiés et traités.

Les performances des biocapteurs sont généralement évaluées expérimentalement par leur sensibilité, leur limite de détection, leur gamme linéaire, leur reproductibilité et leur sélectivité. D'autres paramètres incluant le temps de réponse, la stabilité opérationnelle et la stabilité de stockage du capteur s'avèrent aussi indispensables. Idéalement, la surface de détection est régénérée pour que le transducteur soit recyclable. Dans certains cas, notamment dans le domaine de l'analyse clinique, l'usage unique peut toutefois être plus adapté.

Un grand nombre de travaux ont été dédiés ces dernières décennies au développement de biocapteurs pour des applications très variées dans le domaine de la santé [6,7], l'environnement [8], l'industrie agroalimentaire [9,10], l'espace [11] ou encore le bioterrorisme [12].

I.1.2. Les éléments de reconnaissance

Les éléments de reconnaissance biologique, appelés aussi biorécepteurs, sont la clé de la technologie des biocapteurs. Par définition, un biorécepteur est une espèce moléculaire qui utilise un mécanisme de reconnaissance biochimique spécifique. Son choix est tributaire de plusieurs paramètres : sa stabilité, sa durée de vie, la spécificité de sa réponse et la facilité de son utilisation aussi bien que de la nature des molécules à analyser. Les biorécepteurs peuvent être classés selon leur type d'activité (Fig I.2). On distingue les biorécepteurs

d'affinité, qui fixent simplement l'analyte sans le modifier, les biorécepteurs métaboliques, qui possèdent une activité catalytique, et une autre catégorie récemment intégrée : les récepteurs biomimétiques [13].

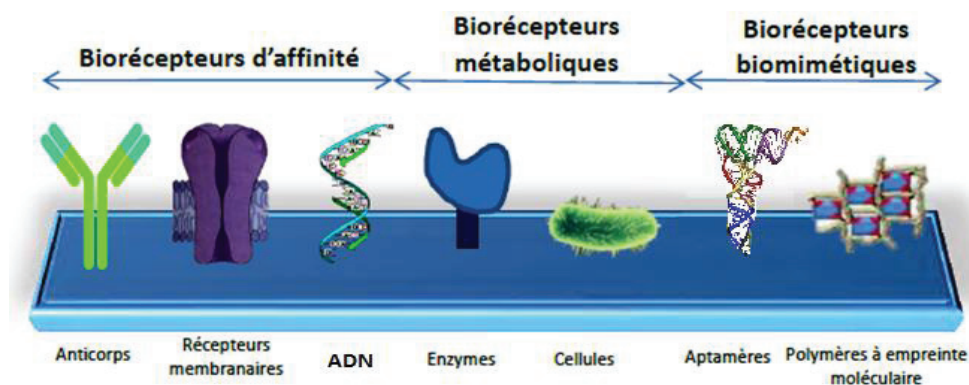


Figure I.2. Les différents types de biorécepteurs

I.1.2.1. Biorécepteurs d'affinité

Ce type de biorécepteur fixe l'analyte sans provoquer de réaction chimique. Il est caractérisé par sa haute sélectivité et sa forte affinité vis-à-vis de l'analyte. La liaison mise en jeu lors de l'interaction n'est pas covalente, seules des liaisons hydrogènes, ioniques, de Van der Waals et/ou hydrophobes sont formées. Cette liaison est cependant extrêmement forte du fait de l'existence de nombreuses interactions moléculaires.

Les anticorps

Les anticorps sont des glycoprotéines produites par l'organisme suite à l'introduction d'un antigène étranger (Fig I.3). Ces glycoprotéines sont capables de réagir spécifiquement avec cet antigène et de le neutraliser. Grâce à leur grande spécificité, l'utilisation des anticorps convient à la détection de faibles concentrations d'analytes dans des milieux complexes [14]. Cependant, l'interaction antigène-anticorps n'est pas toujours réversible et l'étape de régénération peut induire une perte progressive de la sensibilité et de la spécificité des biomolécules. Un manque de contrôle de l'orientation des anticorps sur la surface de détection, peut par ailleurs être à l'origine d'un manque de reproductibilité du biocapteur. On distingue deux types d'anticorps : les anticorps monoclonaux sont des anticorps ne reconnaissant qu'un seul type d'épitope sur un antigène donné. Ils sont par définition tous identiques et produits par un seul clone de plasmocyte. Les anticorps polyclonaux sont un mélange d'anticorps reconnaissant différents épitopes sur un antigène donné sécrétés par différents clones de plasmocytes.



Figure I.3. Structure schématique d'une molécule d'anticorps

Les récepteurs membranaires

Ce sont des protéines d'origine non-immune, localisées dans la membrane cellulaire, dans le cytoplasme et dans le noyau (Fig I.4). Ils sont capables de réagir avec une grande variété de molécules (les hormones, les neurotransmetteurs, les facteurs de croissance ou les molécules odorantes). Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) constituent la plus grande famille de récepteurs membranaires des mammifères puisqu'elle représente 3,4 % de leur génome [15]. Ces protéines transmettent le signal provenant du récepteur à différents effecteurs intracellulaires permettant la génération d'une réponse cellulaire appropriée impliquée dans la vision, le goût, l'odorat, les fonctions nerveuses, le métabolisme et la régulation immunitaire. De ce fait, une attention particulière est portée à ce type de molécules pouvant servir de cible thérapeutique pour diverses maladies. Le développement de biocapteurs capables de détecter et d'identifier la reconnaissance spécifique à base de RCPG constitue un défi et la réussite de la fixation de ce type de molécule à la surface d'un transducteur demeure l'étape la plus critique [16]. Plusieurs techniques ont contribué à l'avancement de la technologie des biocapteurs dans ce domaine, telle que la spectroscopie diélectrique cellulaire [17], mais son application reste relativement limitée.

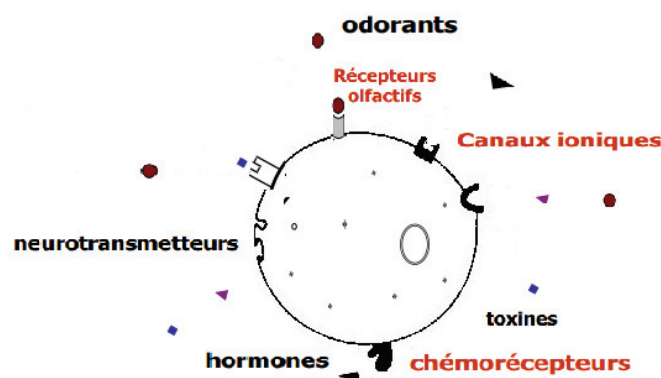


Figure I.4. Représentation schématique des récepteurs membranaires

Les acides nucléiques

Il s'agit des oligonucléotides constituant le matériel génétique cellulaire. Ils peuvent être immobilisés sous forme de double brin ou simple brin sur un transducteur physique. Ces molécules ont la capacité de reconnaître différentes cibles avec une forte affinité. L'ADN a suscité l'attention des chercheurs pour la mise au point de biocapteurs [18]. Ces dispositifs ont été largement utilisés dans l'analyse in situ du cancer [19], la détection de pathogènes [20] et de substances toxiques [21], ou encore dans la mise en évidence de la détérioration des molécules d'ADN en présence de certains polluants [22].

I.1.2.2. Biorécepteurs métaboliques

A la différence des biorécepteurs d'affinité, les biorécepteurs métaboliques catalysent une réaction dans laquelle est consommé l'analyte cible. Ce type de biorécepteur est caractérisé par sa capacité de reconnaissance et sa forte activité à des faibles concentrations.

Les enzymes

Il s'agit d'un catalyseur de réaction biochimique, c'est-à-dire une molécule capable d'accélérer la vitesse d'une réaction (Fig I.5). Elle agit en petite quantité et se trouve inchangée en fin de réaction. Les molécules transformées au cours de la réaction enzymatique sont appelées substrats et celles obtenues en fin de réaction sont appelées produits. La structure et le fonctionnement de ces biorécepteurs seront détaillés dans le paragraphe I.3.

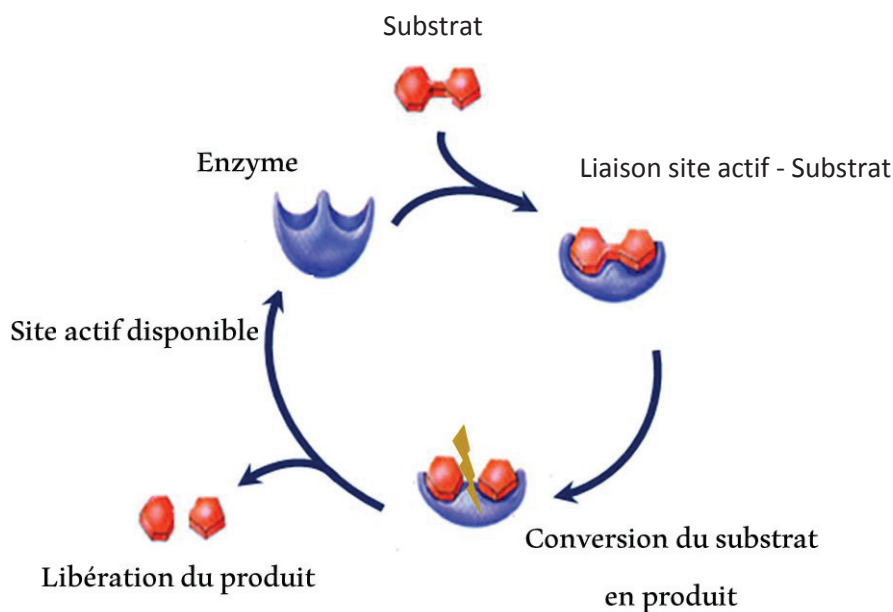


Figure I.5. Mécanisme réactionnel d'une réaction enzymatique

Les microorganismes

Les microorganismes utilisés dans l'élaboration de biocapteurs sont essentiellement des bactéries et des champignons, plus rarement des algues [23]. Ils renferment un grand nombre d'enzymes catalysant des réactions très variées. Ces systèmes de reconnaissance moléculaire présentent l'avantage de ne pas nécessiter les étapes d'extraction ou de purification des enzymes, ils peuvent plus facilement s'adapter à des modifications de pH et de température et ils permettent de régénérer le biocatalyseur in situ sans l'obligation de reconstruire le biocapteur. Leur sélectivité et leur sensibilité sont, toutefois, souvent limitées. De plus, leur temps de réponse est plus élevé que celui des enzymes isolées [24].

I.1.2.3. Les récepteurs biomimétiques

Ce sont des entités synthétiques qui miment le comportement des biorécepteurs naturels.

Les aptamères

Les aptamères sont des simples brins d'ADN ou d'ARN qui ont une capacité à reconnaître différentes cibles, notamment des protéines, avec de fortes affinités et spécificité. Les aptamères présentent certains avantages par rapport aux anticorps. Ils sont faciles à synthétiser, beaucoup plus stables, forment des liaisons spécifiques avec l'analyte, sont moins immunogènes, moins toxiques, et moins chers. Ils peuvent être stockés pendant une longue période et offrent la possibilité de multiples modifications. Les aptamères trouvent leur application comme éléments de biorecognition dans différentes méthodes analytiques : chromatographie, électrophorèse capillaire ainsi que dans la conception de biocapteurs [25–27].

Les polymères à empreinte moléculaire (MIPs)

L'impression moléculaire est un procédé par lequel des monomères fonctionnels s'auto-assemblent autour d'une molécule cible et polymérisent en présence d'un agent de réticulation. Une fois la molécule cible extraite du polymère obtenu, il en résulte une cavité complémentaire en forme et en fonctionnalité capable de reconnaître une molécule identique ou une famille de molécules analogues dans des mélanges complexes. Cette capacité de reconnaissance ainsi que la grande stabilité des MIPs en font des éléments de reconnaissance puissants dans la conception des biocapteurs. Néanmoins, comme tous les autres biorécepteurs ou récepteurs biomimétiques, les MIPs présentent certaines limitations, la principale provenant des difficultés d'optimisation du procédé de synthèse [28] (Fig I.6).

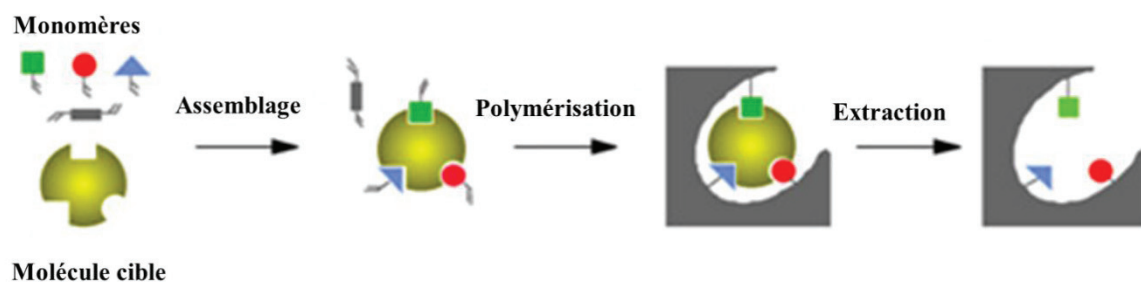


Figure I.6. Synthèse des polymères à empreinte moléculaire

I.1.3. Les modes de transduction

L'information donnée par le transducteur doit, tout comme le biorécepteur, être spécifique et ne doit correspondre qu'à la reconnaissance biologique. Idéalement, le choix du transducteur doit être établi de façon à éviter toute modification du complexe formé et à assurer un suivi en temps réel. Il existe différents types de transducteurs. Parmi les plus utilisés, on distingue les transducteurs de type optique, mécanique, thermique et électrochimique.

I.1.3.1. Transduction optique

Ce type de transduction consiste à transformer l'évènement de reconnaissance biologique sous forme d'une grandeur optique (variation d'indice de réfraction, d'absorbance, de fluorescence, de luminescence...). Les principaux atouts de ces transducteurs sont généralement leur caractère non destructif qui autorise des mesures in situ et en temps réel, leur insensibilité aux interférences électromagnétiques et leur bonne sensibilité de détection. Cependant, la limitation principale de cette technique réside dans la difficulté de son intégration complète sur une puce miniaturisée. La transduction optique reste donc l'archétype d'une méthode de détection excellente, toutefois elle nécessite un appareillage externe non intégrable [29–31].

I.1.3.2. Transduction mécanique

Ce type de transduction est principalement basé sur la génération et la détection d'ondes mécaniques ou acoustiques. Ces ondes se propagent à travers ou à la surface d'un matériau provoquant un changement de vitesse et/ou d'amplitude au niveau de la zone de passage de l'onde propagée [32]. L'augmentation ou la diminution de masse induite par ces variations peut être typiquement suivie par la mesure de spectres en fréquence et corrélées à l'information correspondant à la reconnaissance biologique recherchée. De bonnes performances peuvent être obtenues, mais cette technique s'avère être dépendante de plusieurs facteurs influençant la fiabilité des résultats, tels que la variation de la température, l'atténuation des ondes, le dépôt non-spécifique des molécules, de poussières ou d'autres contaminants sur les cristaux.

I.1.3.3. Transduction thermique

La transduction thermique consiste à mesurer l'énergie produite ou absorbée au cours d'une réaction biochimique. Les transducteurs thermiques sont généralement des thermocouples ou des thermorésistances [33]. Les biocapteurs thermiques les plus utilisés sont enzymatiques mais il existe des biocapteurs thermiques immunochimiques. Ce type de transduction, adapté aux mesures en continu, présente de nombreux avantages tels que la rapidité de réponse, la reproductibilité et l'absence d'interférence électrochimique ou optique. Elle est cependant très peu utilisée à cause du coût élevé de l'instrumentation et des contraintes technologiques liées à la nécessité de compenser les variations parasites de température.

I.1.3.4. Transduction électrochimique

La méthode de détection électrochimique est, avec la transduction optique, la plus répandue dans le domaine des biocapteurs et c'est celle que nous avons choisie d'exploiter dans notre travail. Son principe repose sur la détection de changements électrochimiques lors de l'événement de bio-reconnaissance [34].

Le système électrochimique est composé de deux ou trois électrodes :

- une électrode de travail : stable et conductrice fabriquée à l'aide de métaux nobles tels que l'or, le diamant ou le carbone
- une électrode de référence désignée pour maintenir un potentiel de référence connu et stable
- une électrode auxiliaire qui sert au passage du courant à travers le système et non à travers l'électrode de référence

La transduction électrochimique possède plusieurs avantages à savoir sa sensibilité, sa simplicité, son faible coût, et éventuellement sa miniaturisation et son intégration dans des dispositifs automatisés. Les biocapteurs électrochimiques s'avèrent, alors, très prometteurs et font actuellement l'objet d'intenses recherches [35].

Il existe différents types de biocapteurs électrochimiques qui sont classés selon leur mode de détection [36] :

- ✓ La potentiométrie mesure le changement de potentiel de charge à une électrode de travail par rapport à une électrode de référence dont le potentiel reste constant. La potentiométrie fournit donc des informations sur l'activité des ions mis en jeu lors d'une réaction électrochimique.
- ✓ L'ampérométrie et la voltammétrie sont basées sur la mesure du courant électrique produit lorsqu'un potentiel est appliqué entre une électrode de référence et une électrode de travail. Le courant mesuré est le résultat du processus de réduction ou d'oxydation électrochimique d'une espèce électroactive produite lors d'une réaction biochimique ayant lieu à l'électrode de travail. On parle d'ampérométrie lorsque le

courant est mesuré à un potentiel constant et de voltammétrie lorsque la mesure est réalisée lors d'une variation contrôlée de potentiel.

- ✓ La conductimétrie mesure la conductance électrique d'une solution électrolytique contenant des charges électriques mobiles, constituées par l'ensemble des ions.
- ✓ La spectroscopie d'impédance électrochimique mesure le changement d'impédance (à la fois la résistance et la réactance). C'est une excellente technique pour étudier les propriétés électriques à l'interface électrode/électrolyte.

La conductimétrie

Le principe de ce mode de détection repose sur la mesure de la variation de conductivité d'une solution induite par la production d'espèces chargée. La surface S et la longueur l des électrodes sont déterminées par étalonnage dans une solution de conductivité connue. La conductance électrique G est proportionnelle à la surface S de la section perpendiculaire à la direction du courant et inversement proportionnelle à sa longueur. Elle est donnée par l'équation suivante (Eq.I.1) :

$$G = \gamma S / l \quad (\text{Eq.I.1})$$

G : Conductance (S), S : Surface de la section (cm^2), l : longueur de la section (cm), γ : conductance spécifique ou conductivité (S/cm).

En pratique la mesure de la conductance d'un électrolyte s'effectue en immergeant dans la solution une cellule de mesure comprenant deux électrodes soumises à un signal électrique. (Fig I.7). La mesure de conductance ne peut être effectuée qu'en courant alternatif pour minimiser les effets dus à la polarisation des électrodes et à une fréquence suffisamment élevée pour éliminer ces effets perturbateurs. La conductivité dépend de la nature des ions présents dans la solution (leur charge et leur mobilité) et de leurs concentrations. La température est également un facteur jouant sur la conductivité.

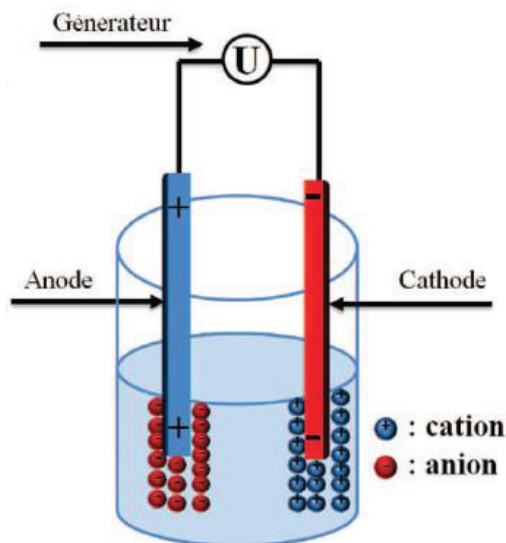


Figure I.7. Principe de la détection conductimétrique

Les transducteurs conductimétriques ont été utilisés pour la mise au point de biocapteurs étant donné le nombre d'avantages qu'ils offrent : ils sont sensibles, simples d'utilisation, ne nécessitent pas d'électrode de référence et sont faciles à miniaturiser. La détection de la conductance de la solution n'est cependant pas assez spécifique, c'est pourquoi les transducteurs conductimétriques sont souvent associés à des biorécepteurs catalytiques tels que les enzymes [37]. Néanmoins, d'autres éléments de reconnaissance ont été utilisés pour le développement de biocapteurs conductimétriques comme les algues pour la détection des métaux lourds [38], les bactéries [39], l'ADN pour la détection des virus [40] et les anticorps pour la détection des bactéries [41].

A notre connaissance, un seul biocapteur conductimétrique a été rapporté dans la littérature pour la détection des mycotoxines, plus particulièrement l'AFB1. Il s'agit d'une détection indirecte basée sur l'inhibition de l'activité enzymatique de la HRP en raison de la formation du complexe immun (antiAFB1-AFB1) à la surface de l'électrode. Le biocapteur a montré de bonnes performances avec une réponse linéaire dans un intervalle de 0.2 à 10 ng/mL et une limite de détection basse de 0.1 ng/mL [42].

L'impédancemétrie

La spectroscopie d'impédance électrochimique est une technique non destructive adaptée à l'étude des propriétés électriques interfaciales. Elle permet de différencier les divers phénomènes susceptibles de se produire dans la cellule électrochimique en fonction de la fréquence. Le transfert de charge qui a lieu entre l'interface et l'électrode est défini comme un phénomène rapide qui se produit à hautes fréquences, tandis que le transport de matière qui a lieu entre l'interface et l'électrolyte, est défini comme un phénomène plutôt lent qui se déroule à basses fréquences. La mesure de l'impédance s'effectue dans une cellule classique à trois électrodes (Fig I.8).

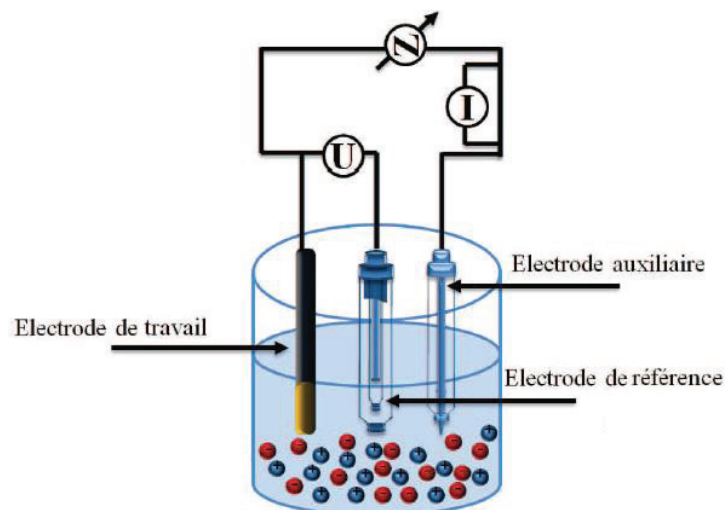


Figure I.8. Principe de la détection impédancemétrique

La perturbation imposée est classiquement sinusoïdale. Le signal appliqué est donc de la forme $x(t) = A \sin(\omega t)$ et la réponse du système est $y(t) = B \sin(\omega t + \varphi)$ avec une fréquence f , une pulsation $\omega = 2\pi f$ et un déphasage φ . L'impédance électrochimique se définit comme étant le nombre complexe $Z(\omega)$:

$$Z(\omega) = \Delta E(\omega) / \Delta I(\omega)$$

où, en mode potentiostatique, $\Delta E(\omega)$ est la perturbation imposée à un potentiel choisi E , et $\Delta I(\omega)$ la réponse en courant du système étudié avec une composante continue I . L'impédance $Z(\omega)$ est un nombre complexe qui peut être écrit sous deux formes équivalentes :

$$Z(\omega) = |Z(\omega)| e^{j\varphi(\omega)} \quad \text{ou} \quad Z(\omega) = Z_r(\omega) + j Z_i(\omega)$$

$|Z|$ étant le module de l'impédance, φ le déphasage, ω la vitesse angulaire appelée aussi pulsation, Z_r la partie réelle et Z_i la partie imaginaire.

Plusieurs types de diagrammes sont utilisés pour représenter l'impédance électrochimique $Z(\omega)$. Le diagramme de Nyquist est obtenu en traçant l'opposé de la partie imaginaire de l'impédance $-Z_i(\omega)$ en fonction de sa partie réelle $Z_r(\omega)$. Le diagramme de Bode est obtenu en traçant respectivement $\log |Z(\omega)|$ et la phase en fonction de $\log(\omega)$ ou $\log(f)$. Ces deux modes de représentation de l'impédance donnent des visualisations des résultats différentes mais restent complémentaires. La présentation de Bode est préférée lorsque des informations observées à haute fréquence sont masquées par la représentation de Nyquist. Elle permet de mieux visualiser les points d'inflexion du module de l'impédance, les variations de phase ainsi que les différentes constantes de temps des phénomènes mis en jeu. A l'inverse, certains phénomènes caractéristiques se déroulant à l'interface électrode de travail/électrolyte sont plus facilement visualisés par la représentation de Nyquist. Cette dernière permet de déterminer certains paramètres (Fig I.9) :

- ✓ La résistance de la solution (R_s) : correspond à la valeur sur l'axe Z_r au départ du demi-cercle) due à la chute ohmique entre l'électrode de travail et l'électrode de référence.
- ✓ La résistance de transfert de charge (R_{ct}) se lit sur l'axe Z_r et équivaut au diamètre du demi-cercle. Elle correspond au transfert d'électrons entre l'électrode de travail et l'électrolyte. En absence d'une espèce redox, R_{ct} est remplacée par la résistance de polarisation dite (R_p).
- ✓ La capacité de double couche (C_{dc}) caractérise l'interface métal/solution qui est une zone de distribution de charges. Pour tenir compte des imperfections de l'interface notamment de la rugosité et de l'inhomogénéité de la couche organique sur une électrode modifiée, la C_{dc} est substituée par des éléments de phase constante (CPEs)
- ✓ Z_w qui traduit le phénomène de diffusion pure, reflète l'influence du transport de matière de l'espèce électroactive de l'électrolyte vers l'électrode.

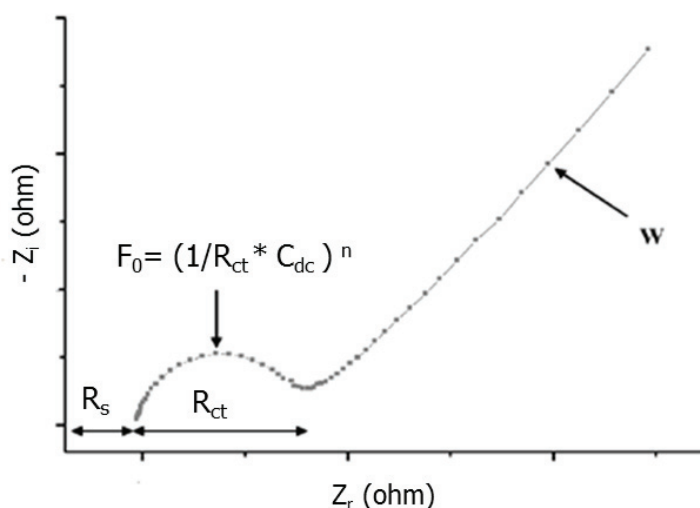


Figure I.9. Calcul des différents paramètres à partir du diagramme de Nyquist.

Les différents processus se déroulant à l'interface électrode/électrolyte peuvent être modélisés par la construction d'un circuit électrique équivalent formé d'éléments idéaux (capacités et résistances). Chacun des composants utilisés, branchés en série ou en parallèle, représente un phénomène physique particulier. Ces modèles sont ensuite utilisés pour ajuster les diagrammes expérimentaux afin d'extraire les paramètres nécessaires à la compréhension du système étudié. Bien entendu, cette façon de faire est une simplification et suppose que les différents phénomènes sont indépendants les uns des autres, ce qui n'est pas le cas dans la réalité. Toutefois, l'erreur introduite par l'utilisation de cette forme de modèle doit être suffisamment faible pour que cette simplification puisse être considérée comme acceptable.

La spectroscopie d'impédance électrochimique a été développée notamment pour caractériser la fabrication des biocapteurs et pour contrôler les réactions enzymatiques ou les phénomènes de reconnaissance moléculaire de fixation de protéines spécifiques, de récepteurs, d'acides nucléiques, de cellules entières ou d'anticorps. Ce mode de transduction s'applique avantageusement aux réactions d'affinité (antigène-anticorps, chémorécepteurs membranaires..) car elles induisent de faibles variations de conductance et de capacitance au niveau de l'interface électrode-biorécepteur immobilisé. Généralement, il est judicieux d'utiliser une autre méthode de détection lorsqu'il s'agit d'une analyse sur des échantillons réels.

La voltampérométrie cyclique

La voltampérométrie (ou voltammétrie) cyclique est une technique basée sur la mesure du courant résultant d'un balayage linéaire en potentiel entre les limites E_{inf} et E_{sup} choisies par l'expérimentateur. La programmation en potentiel est dite triangulaire (Fig I.10) et est caractérisée par la vitesse de balayage v :

$$v = dE / dt$$

Plusieurs cycles consécutifs peuvent être exécutés, chacun étant représenté par un tracé du courant enregistré en fonction du potentiel appliqué, appelé voltammogramme (Fig I.10).

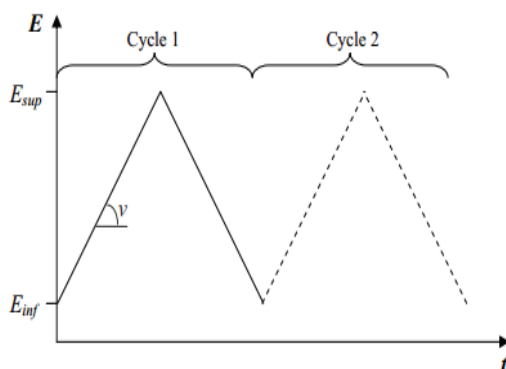


Figure I. 10. Programmation du potentiel au cours du temps en voltammétrie cyclique

Le courant mesuré est la somme de deux contributions à l'interface électrode/solution : le courant capacitif lié à l'existence de la double couche électrique et le courant faradique associé aux processus d'oxydo-réduction, soit :

$$i = i_c + i_f = dQ_c / dt + dQ_f / dt$$

i étant le courant total, i_c et i_f respectivement les courants capacitif et faradique, Q_c et Q_f les charges capacitives et faradiques et t le temps.

Le courant faradique revêt différentes expressions plus ou moins complexes selon le système considéré. En fonction de la forme de sa dépendance en fonction de la vitesse de balayage, il est possible d'en déduire certaines caractéristiques de la réaction, comme sa

réversibilité ou l'intervention d'espèces adsorbées. Le courant faradique varie également avec la concentration de l'espèce électroactive et l'aire de l'électrode. Pour éliminer l'influence de ce dernier facteur, le courant est usuellement normalisé par rapport à l'aire de l'électrode et présenté sous la forme d'une densité de courant $j = i/A$.

Le balayage des potentiels s'effectue de façon cyclique à vitesse constante. Après avoir balayé vers les potentiels anodiques et réalisé une oxydation, on inverse le sens de variation du potentiel pour effectuer une exploitation vers les potentiels cathodiques. Si le balayage est suffisamment rapide, le produit formé à l'aller est encore présent au balayage retour et peut se réduire. On enregistre donc sur le voltammogramme les courbes de polarisation anodique et cathodique (Fig I.11). Une rapidité suffisante de la vitesse de balayage permet d'obtenir une bonne résolution et une bonne reproductibilité des résultats car l'aller et le retour nettoient la surface de l'électrode de travail.

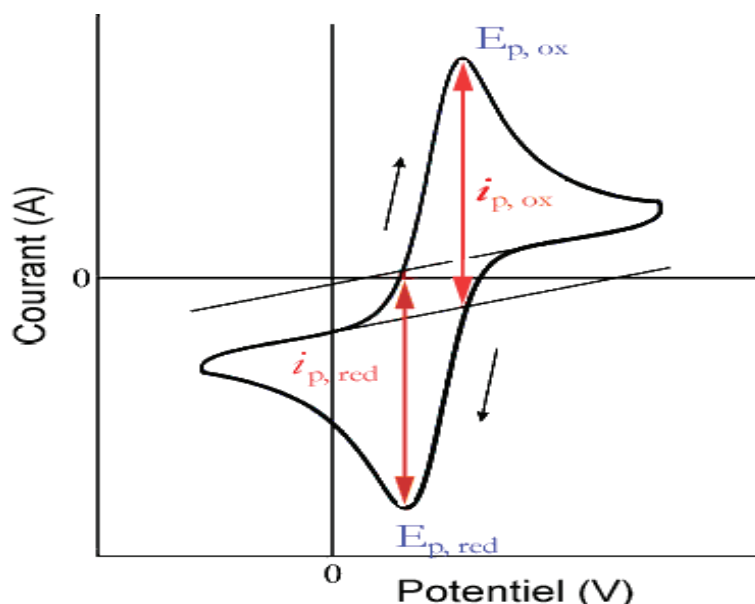


Figure I.11. Représentation typique d'un voltammogramme

Dans le domaine des biocapteurs, la voltammétrie cyclique a souvent servi de méthode de caractérisation en complément à une autre méthode de détection, le plus souvent l'ampérométrie. C'est le cas par exemple de la détermination de l'aflatoxine M1 dans des échantillons de lait. Avec l'utilisation de cette approche, la limite de détection a été estimée à 8 ng L^{-1} , avec un domaine linéaire de $10\text{-}100 \text{ ng L}^{-1}$ [43]. La voltammétrie cyclique suivie par des mesures de spectroscopie d'impédance a été utilisée pour développer un biocapteur à OTA. Le dispositif montre un domaine linéaire de $1\text{-}20 \text{ ng/mL}$ avec une limite de détection de 0.5 ng/mL [44]. Néanmoins, cette technique est quelque fois utilisée comme méthode de détection. Dans ce contexte, Wu et al., ont élaboré un biocapteur à base de glucose oxydase pour la détection du glucose [45]. Une réponse linéaire a été observée pour des concentrations de glucose allant de $50 \text{ }\mu\text{M}$ à 10 mM , avec une sensibilité élevée et une limite de détection basse de $1 \text{ }\mu\text{M}$. Le biocapteur a également montré une haute sélectivité ainsi qu'une longue durée de vie.

I.1.3.5. Les transducteurs électrochimiques

Différents types de transducteurs électrochimiques ont été développés. La nature du matériau qui constitue l'électrode, sa taille et sa géométrie ou encore sa technique de fabrication les rendent spécifiques [46,47].

Les métaux nobles sont souvent utilisés en raison de leurs caractéristiques avantageuses. L'or, l'argent ou le platine offrent une fenêtre de potentiel plus large avec une grande stabilité, une bonne conductivité, un faible courant et une grande inertie chimique. Dans notre travail, nous avons utilisé des microélectrodes interdigitées en or. L'or est le métal le plus électronégatif. Il ne s'ionise pas facilement et offre une grande résistance à l'oxydation. Il est très inerte chimiquement. En revanche, il interagit facilement avec les groupements thiols et amines des molécules.

Comme nous le verrons plus en détail dans le chapitre suivant, les transducteurs conductimétriques utilisés sont constitués de deux électrodes interdigitées, l'une servant d'électrode de travail, sur laquelle est immobilisée le biorécepteur, et l'autre de référence. Chaque électrode est constituée de microbandes parallèles alternativement interconnectées, formant une structure en peignes interpénétrés, un peigne servant d'anode et le deuxième de cathode. Les bandes ont généralement quelques dizaines de microns d'épaisseur et sont séparées par quelques microns. Ceci permet que l'espèce générée sur l'une des bandes soit re-consommée à la bande suivante (Fig I.12). L'efficacité de ce procédé de recyclage dépend de la largeur de l'électrode et de la distance entre les électrodes voisines. Le nombre de bandes n'a pas d'influence significative sur le rapport signal-sur-bruit (S/N), le bruit de fond (proportionnel à la surface des électrodes seules) augmentant de la même manière que le signal (proportionnel à la surface totale). Par contre, S et S/N croissent lorsqu'on diminue la largeur des doigts.

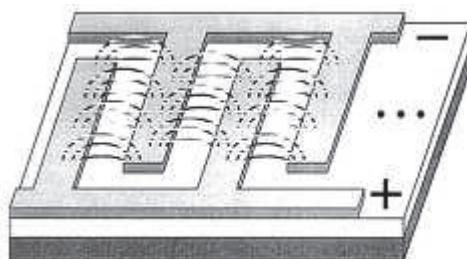


Figure I.12 : Illustration du procédé de recyclage des espèces redox des électrodes interdigitées [48]

Le comportement des électrodes peut être modélisé par le circuit électrochimique équivalent présenté sur la Fig I.13.

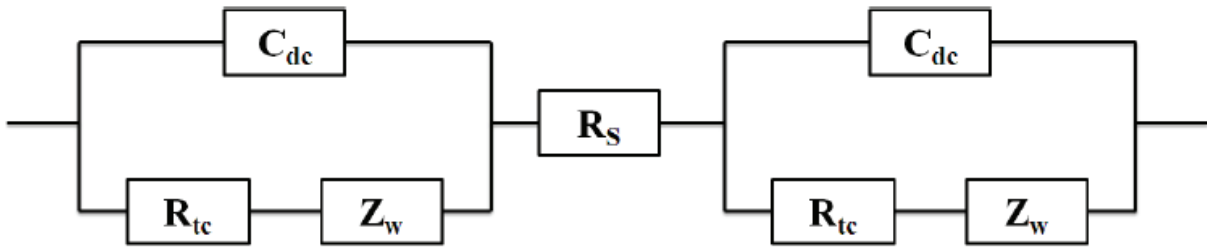


Figure I.13. Modèle de circuit équivalent au transducteur conductimétrique à deux électrodes interdigitées

A des fréquences supérieures à 10 kHz, l'impédance de diffusion (Z_w) peut, cependant, être négligée et l'impédance totale du système consiste principalement en la résistance de la solution d'électrolyte (R_s), la capacité de la double couche (C_{dc}) et la résistance de transfert de charge R_{tc} . Etant donné que le système de mesure utilisé opère à 100 kHz, le modèle de circuit équivalent peut alors être simplifié (Fig I.14) :

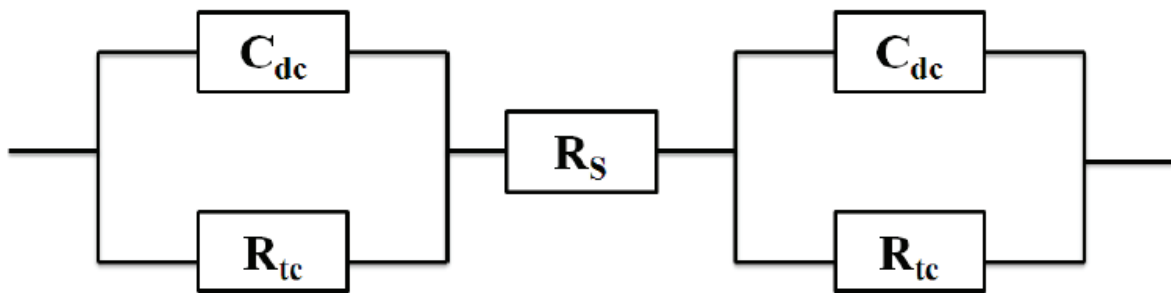


Figure I.14. Modèle de circuit simplifié équivalent au transducteur conductimétrique à deux électrodes interdigitées

L'impédance totale du système peut être décomposée en :

$$Z = Z_r + Z_c$$

Avec Z_r : composante résistive de l'impédance ; Z_c : composante capacitive de l'impédance
Et comme à haute fréquence la valeur de l'impédance n'est pas affectée par la résistance de transfert de charge R_{tc} , l'impédance en phase est égale à la résistance de la solution.

L'intensité du signal en phase est donc égale à :

$$I = \frac{U_{excitation}}{Z_{phase}} = \frac{U_{excitation}}{R_{sol}} = U_{excitation} * G$$

- G est la conductance exprimée en Siemens (S)

Dans notre système de mesure, les électrodes interdigitées sont recouvertes par la membrane bioactive ou une membrane de référence. Les intensités sont directement converties en une tension (U_{out}) au niveau de la détection synchrone (convertisseur courant/tension) aux bornes de la résistance de charge $R_{circuit}$:

$$I = \frac{U_{out}}{R_{circuit}}$$

Nous avons donc :

$$\frac{U_{out}}{R_{circuit}} = U_{excitation} * G \rightarrow U_{out} = U_{excitation} * G * R_{circuit}$$

Il est possible alors de déduire la formule pour déterminer G

$$G = \frac{U_{out}}{U_{excitation} * R_{circuit}}$$

I.1.4. Les méthodes d'immobilisation

La conception d'un biocapteur nécessite l'immobilisation de l'élément de reconnaissance sur le transducteur. Le choix de la technique d'immobilisation dépend du type de matériel biologique fixé, du substrat à analyser ainsi que de la configuration du transducteur. Quelle que soit la technique utilisée, celle-ci doit conserver la conformation du matériel biologique, garantir l'accès de l'analyte et permettre la transmission du signal à travers la couche sensible immobilisée sur le transducteur.

Parmi les différentes méthodes d'immobilisation [49], on distingue :

I.1.4.1. Adsorption

L'adsorption physique est la méthode la plus simple qui permet l'immobilisation de l'élément biologique sur le transducteur (Fig I.15). Elle met en jeu des interactions faibles de type Van der Waals, des liaisons hydrogènes, des transferts de charges ou encore des interactions homophiles entre les groupements fonctionnels de la biomolécule active et la surface du support. Dans tous les cas, il suffit de laisser en contact le biorécepteur à un pH, une force ionique et une température convenables. Il s'agit d'une technique non dénaturante qui préserve la structure de la molécule adsorbée et qui permet la régénération du biocapteur. L'inconvénient majeur de cette technique est la faible résistance de l'assemblage. Les phénomènes de désorption sont régulièrement observés suite à des variations de conditions du milieu (pH, force ionique, température). La stabilité et la durée d'utilisation des biocapteurs ainsi obtenus se trouvent diminuées.

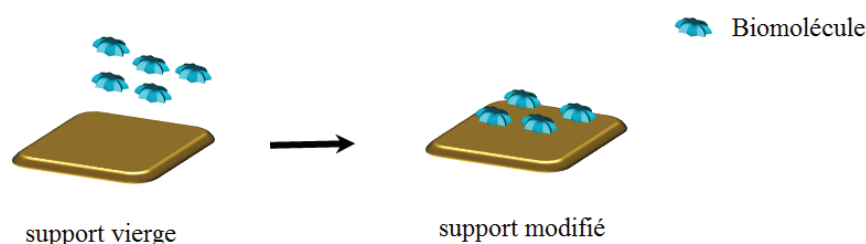


Figure I.15. Immobilisation des biomolécules par adsorption

I.1.4.2. Liaison covalente

Il s'agit de créer des liaisons fortes et irréversibles entre les groupements fonctionnels du bioélément et les groupes réactifs du transducteur. Une fonctionnalisation et/ou une activation préalable, soit du biorécepteur, soit du support, est souvent nécessaire. Il est préférable de fonctionnaliser/activer le support afin de maintenir l'activité de la biomolécule [50].

Cette méthode est considérée comme une méthode simple, efficace et irréversible, toutefois elle doit faire l'objet de précautions car elle peut impliquer des changements drastiques des performances du biorécepteur en termes de sensibilité, de sélectivité et de stabilité, voire même le détruire [51].

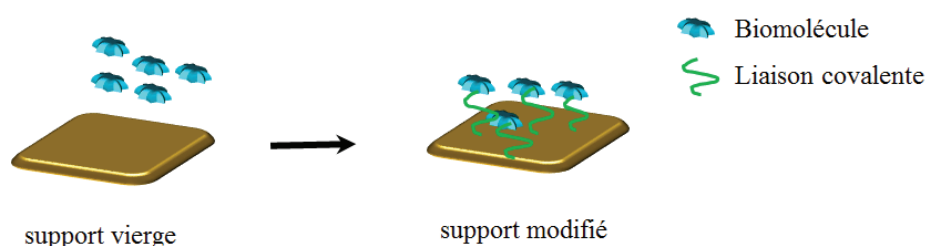


Figure I.16. Immobilisation des biomolécules par liaison covalente

I.1.4.3. Réticulation et co-réticulation

Il s'agit dans ce cas d'immobiliser les éléments biologiques, essentiellement les enzymes, en utilisant un réticulant. Celui-ci est un agent bifonctionnel qui permet de lier les biomolécules entre elles par des liaisons chimiques, donnant ainsi des composés de hautes masses moléculaires insolubles dans l'eau. En présence d'une autre protéine inactive telle que l'albumine de sérum bovin, on parle de co-réticulation. L'utilisation de cette protéine permet, par une meilleure répartition des masses, une meilleure maîtrise de l'activité enzymatique sans altérer les propriétés mécaniques des membranes obtenues. L'agent de réticulation le plus utilisé est le glutaraldéhyde (GA) [52].

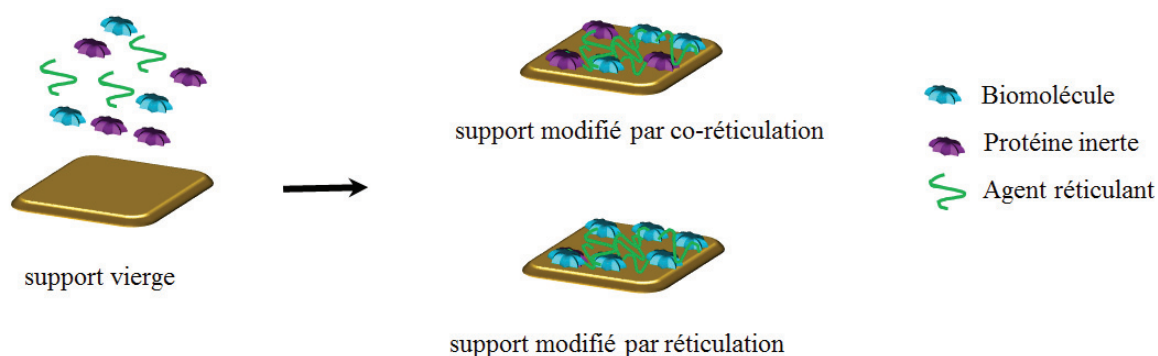


Figure I.17. Immobilisation des biomolécules par réticulation et co-réticulation

Le GA est un liquide incolore très odorant à l'aspect huileux, soluble dans l'eau, dans l'alcool et dans le benzène. Généralement vendu sous forme de solution aqueuse contenant entre 1 et 50% de glutaraldéhyde et 0,05 à 0,5% d'un agent stabilisant comme le méthanol, il est souvent utilisé comme désinfectant ou agent de stérilisation à froid. En biologie, il est employé comme fixateur cellulaire ou agent de réticulation de protéines et particulièrement les enzymes. Sous ses différentes formes (libre, linéaire monohydrate et dihydrate, hémi-acétal cyclique et oligomérique...), le GA réagit essentiellement avec les groupements amines des protéines créant des ponts intra- et intermoléculaires, ce qui immobilise les molécules tout en préservant leur activité et leur conformation [53].

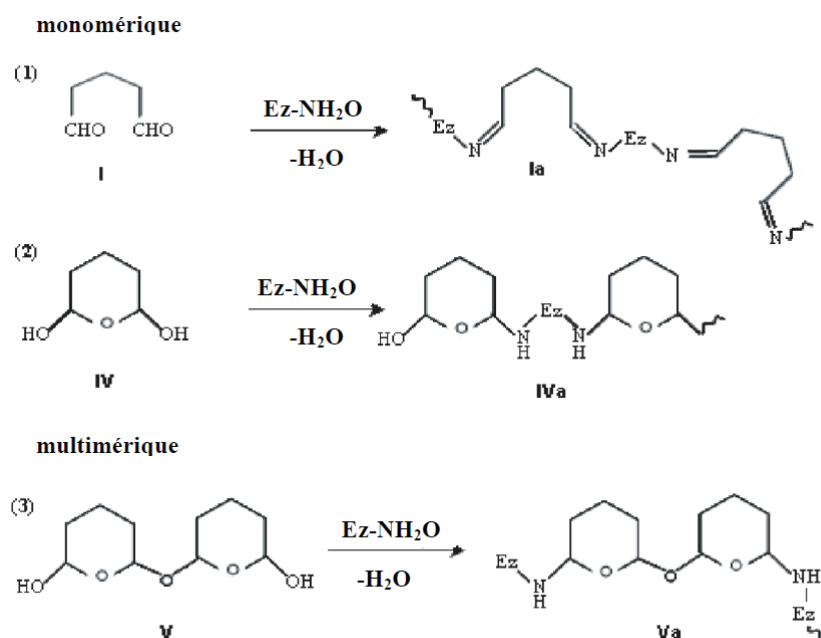


Figure I.18. Réactions des différentes formes de GA avec les enzymes.

Il est primordial, lors de l'étape d'immobilisation par le GA, de contrôler certains paramètres tels que le temps de réticulation. En effet, pour de faibles temps de réaction, les connexions formées sont insuffisantes pour obtenir une membrane assez dense et un relargage

de l'enzyme est possible. A l'inverse, pour des temps trop longs, la forte réticulation peut entraîner un changement de conformation, en particulier une déformation de la structure du site actif, affectant ainsi l'activité biologique de l'enzyme.

Le GA a été abondamment utilisé, sous forme liquide [54] ou gazeuse [55], pour l'immobilisation d'enzymes ou de cellules en vue du développement de biocapteurs. L'emploi de la forme gazeuse est souvent préféré car ce procédé est considéré comme moins agressif pour la biomolécule. C'est donc cette méthode que nous avons sélectionnée dans le présent travail.

I.1.4.4. Piégeage dans des matrices polymériques

Généralités

Le piégeage consiste à incorporer le biorécepteur dans un réseau polymérique. La biomolécule, le plus souvent une enzyme, est mélangée à une solution de polymère, puis déposée à la surface du transducteur sous certaines conditions [51]. Elle se trouve piégée mécaniquement à l'intérieur de la matrice, qui doit permettre la diffusion du substrat vers le site actif et des produits de la réaction (ou des électrons générés) vers l'électrode. La sélectivité peut être maintenue grâce au contrôle de la porosité du matériau ainsi que de ses propriétés chimiques.

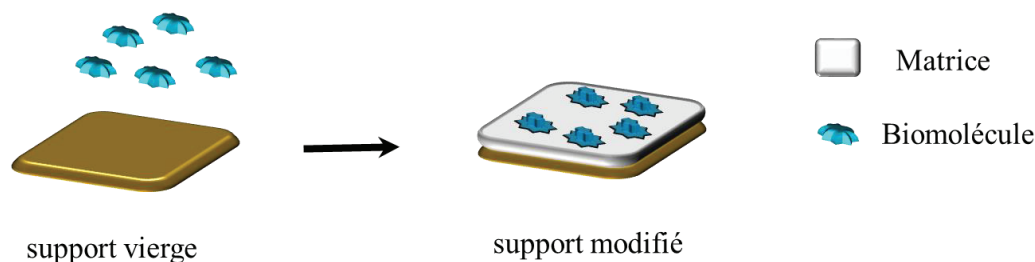


Figure I.19. Immobilisation des biomolécules par piégeage

Cette technique présente l'avantage d'être simple à mettre en œuvre, rapide, conserve l'élément biologique immobilisé et permet le dosage simultané de différents éléments avec un seul et unique dispositif. Elle permet également, avec le contrôle de la concentration du polymère, de maîtriser la taille des pores et maîtriser ainsi l'accès des réactifs et/ou le risque de fuite de la biomolécule. L'activité des biomolécules risque cependant d'être dépendante de l'environnement local (pH, force ionique, etc.) et l'accès du substrat au site actif de l'enzyme peut se trouver également limité. La vitesse et le temps de réponse du biocapteur peuvent être aussi influencés.

Une grande variété de polymères a été rapportée pour l'immobilisation des biorécepteurs dans le développement des biocapteurs, en particulier pour l'immobilisation d'enzymes (Fig I.20.)

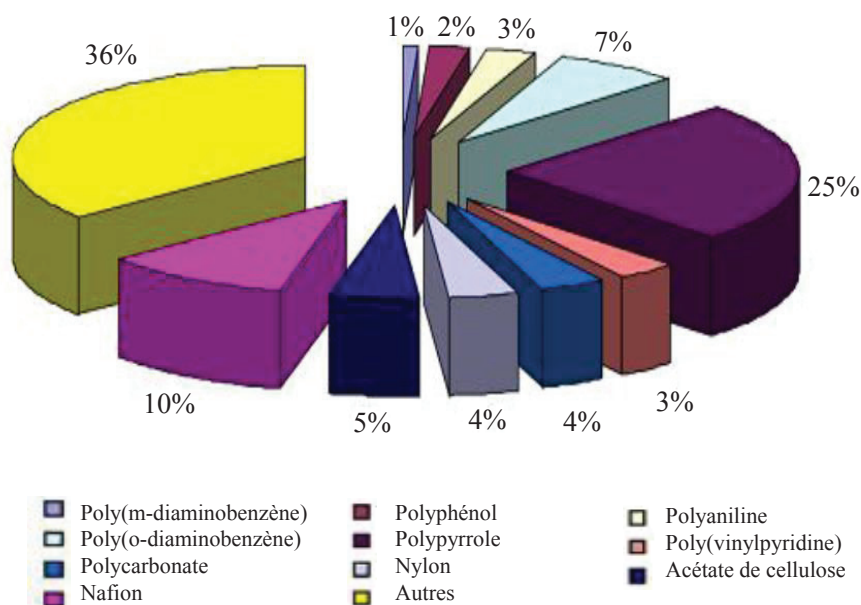


Figure I.20. Polymères utilisés dans l'élaboration de biocapteurs enzymatiques (JARRAR thèse.2011)

On peut diviser les polymères utilisés pour l'immobilisation des enzymes en deux classes : les polymères conducteurs et les polymères non conducteurs.

Les polymères conducteurs sont les plus utilisés dans le développement des biocapteurs électrochimiques [56]. On distingue essentiellement le poly(pyrrole) et ses dérivés, la poly(aniline), le poly(carbazole) ... Leur utilisation s'explique par leur capacité à augmenter la sensibilité et la rapidité de la réponse des électrodes. Ils servent, en effet, à la rétention de la biomolécule et facilitent le transfert direct des électrons entre le site actif de la biomolécule et le polymère. Ces polymères sont, cependant, pour la plupart instables dans le temps à cause de l'action de certains facteurs à savoir la température, l'humidité et la lumière combinées à la présence d'oxygène. Cette instabilité se traduit par une diminution importante de leur conductivité électrique au cours du temps [57]. L'utilisation d'additifs ainsi que le choix judicieux d'anions dopants ou de matériaux barrières à l'oxygène permettent de limiter en partie ce phénomène

En ce qui concerne les polymères non conducteurs, les travaux relatifs à leur utilisation sont moins nombreux. On peut néanmoins citer quelques exemples d'application telles que la détection de glucose, du H_2O_2 , de certaines protéines (la myoglobine, l'hémoglobine, la HRP) et d'autres composés (nitrométhane, composés phénoliques, oxalate) [58]. Ces films non conducteurs comme le poly (phénol) et ses dérivés, le poly(pyrrole) suroxydé ou encore le poly(phénylènediamine) sont souvent utilisés avec des médiateurs redox pour le développement de biocapteurs électrochimiques [59]. Leur incorporation dans la technologie des biocapteurs se justifie principalement par les avantages impressionnants qu'ils offrent à savoir leur grande stabilité, leurs propriétés physiques, leur capacité de rétention des biomolécules et leur faible coût [60,61].

Le PVA

L'alcool polyvinylique (PVA) a été découvert par les chercheurs de Consortium et un brevet allemand a été déposé en 1924 (Herramn, Haehnel, 450.286). Le PVA est un polymère organique d'origine synthétique de formule chimique $(C_2H_4O)_n$ (Fig.I.21). Il est obtenu par saponification ou alcoololyse d'un ester polyvinylique. La quantité de groupements acétyles résiduels influence ses propriétés. En effet, plus la réaction est complète, plus le produit est soluble dans l'eau et insoluble dans les solvants organiques.

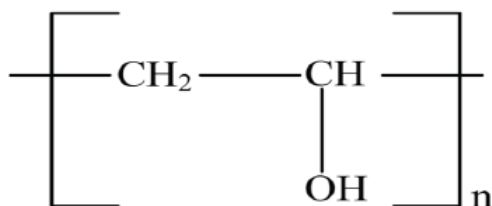


Figure I.21. Formule chimique du PVA

Le PVA est doté d'une stabilité chimique élevée. En raison de ses excellentes propriétés physiques et mécaniques il est utilisé pour un grand nombre d'applications. On le retrouve dans les colles et les peintures. Il est également employé comme agent de démoulage ou encore dans l'agroalimentaire pour ses propriétés de conservation. L'alcool polyvinylique est repris comme additif dans l'alimentation industrielle, sous le code E1203. Sa flexibilité et son caractère fortement hydrophile lui offrent la possibilité d'emprisonner un large panel de produits biologiques. Bien que la plupart des études réalisées concernent l'immobilisation d'enzymes, le PVA peut également être utilisé en tant que matrice de support pour les nucléotides, les protéines ou même les bactéries [62–65]. Cette immobilisation peut avoir lieu par formation de liaisons covalentes, par adsorption, ou bien par réticulation [66–68]. Sa grande affinité pour l'eau permet de conserver un taux d'humidité résiduel assez important permettant d'assurer la durée de vie du matériel biologique. Le PVA peut être utilisé seul ou combiné à d'autres matériaux tels que des fibres de soie, du gel de silice, de la polyaniline [69,70].

Le PEI

Le polyéthylèneimine (PEI) est un polymère connu depuis plus de cinquante ans, de formule chimique $(C_2H_5N)_n$. De par l'existence d'un grand nombre de groupements amines sur son squelette, le PEI est très soluble dans l'eau et dans les solvants polaires tels que le méthanol, peu soluble dans l'acétate d'éthyle, le tétrahydrofurane (THF) et insoluble dans le n-hexane. Sa viscosité dépend de son poids moléculaire et de sa teneur en eau. Le PEI existe sous deux formes, linéaire ou ramifiée, ayant des caractéristiques très différentes (Fig I.22). La forme linéaire du PEI est solide à température ambiante et ne contient que des amines secondaires, tandis que la forme ramifiée est liquide quelle que soit la masse moléculaire et contient des groupements amines primaires, secondaires et tertiaires. C'est cette dernière

forme qui sera utilisée dans notre travail. Le PEI forme la classe des polymères cationiques ayant la plus haute densité de charge par molécule ou par masse avec un pouvoir de fixation très élevé sur les surfaces polaires.

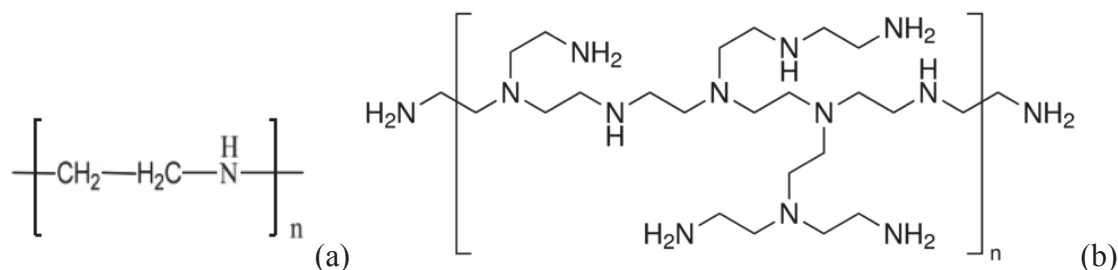


Figure I.22. Structure linéaire (a) et ramifiée (b) du PEI

Compte-tenu de ses caractéristiques physicochimiques, le PEI trouve des applications dans des domaines très variés. En cosmétique, le PEI peut remplir différentes fonctions telle que les soins pour cheveux en raison de sa forte affinité pour les protéines [71]. Dans la synthèse de certains médicaments, le PEI de faible poids moléculaire aide à fixer les substances actives [72]. Le PEI a également été utilisé pour modifier les surfaces actives de certains matériaux comme la silice dans le but d'augmenter leur volume poreux. Ghoul et al. ont montré que la silice modifiée par du PEI possède de meilleures capacités d'extraction des métaux lourds [73]. De même, le PEI peut être combiné à d'autres polymères (polyéthylène, polyester, polycaprolactone....) pour en modifier les propriétés [74].

Le PEI a également été utilisé comme matrice de support pour diverses entités biologiques [75]. Récemment, Tan et al ont montré que l'addition de PEI permet une immobilisation plus efficace de la β -glucosidase. En effet, ils ont constaté que comparativement à l'enzyme libre, la β -glucosidase immobilisée dans une matrice de PEI maintient son activité et s'avère capable de tolérer une gamme de pH plus large et des températures plus élevées (jusqu'à 60 °C) [76].

L'utilisation d'une matrice hybride de PVA/PEI comme support d'enzymes constitue une alternative très avantageuse pour l'élaboration de biocapteurs enzymatiques. Ce mélange de polymères forme un réseau flexible de porosité élevée et de bonne résistance mécanique. Son incorporation contribue à l'amélioration des performances des biocapteurs, cependant il présente une résistivité élevée. L'incorporation de nanostructures conductrices telles que des nanoparticules métalliques ou des nanotubes de carbone s'avère nécessaire pour augmenter la réactivité électrochimique des biomolécules et faciliter les transferts électroniques [77]. Dans ce contexte, Zhu *et al* ont utilisé des nanofibres de PVA / PEI décorés avec des nanoparticules d'argent (AgNPs) pour la détection du peroxyde d'hydrogène, du glutathion et du glucose. Le dispositif développé est caractérisé par une sensibilité élevée, un faible temps de réponse et une grande stabilité [78].

Intégration de nanomatériaux dans l'élaboration de biocapteurs

Les nanomatériaux utilisés pour l'élaboration de biocapteurs sont des structures dont au moins une des dimensions est inférieure à 100 nm. Les nanoparticules d'or, les nanoparticules magnétiques et les matériaux carbonés tels que les nanotubes de carbone sont les plus couramment utilisés dans le domaine des biocapteurs, en particulier des biocapteurs électrochimiques [79–82]. Du fait de leur petite taille et de leur forte surface spécifique, ces nanomatériaux possèdent des propriétés différentes de celles des matériaux à l'état natif. Ces propriétés modulables avec la taille s'avèrent extrêmement intéressantes.

Ces nanomatériaux interviennent, en outre, dans la miniaturisation des dispositifs ainsi que dans le développement de nouveaux systèmes d'immobilisation plus efficaces des biorécepteurs. Ils permettent également d'améliorer nettement leurs performances, en particulier leur sensibilité.

Les nanoparticules d'or

De nombreuses méthodes de synthèse de nanoparticules d'or ont été élaborées. La synthèse par voie aqueuse reste la plus utilisée malgré son ancienneté [83]. Son principe se base sur la réduction de l'acide tétrachloroaurique par le citrate de sodium. Cette méthode permet d'obtenir des nanoparticules d'or entre 15 et 150 nm avec une grande simplicité et rapidité. Le contrôle de la taille de ces particules est régi par les proportions de citrate et de sel d'or lors de la synthèse.

Sous la forme de nanoparticules, l'or présente des propriétés intrigantes que les scientifiques explorent méticuleusement depuis quelques années. Ces propriétés sont d'ordre physique, optique, photo-thermique, chimique et électronique dont on peut citer quelques-unes :

- ✓ A l'état de nanoparticules, l'or subit des changements de propriétés macroscopiques tels que la température de fusion et la température de Tammann (température à laquelle la mobilité et la réactivité des molécules dans un solide devient appréciable).

- ✓ La fréquence de résonance de plasmons dépend de la taille de la particule et de sa forme ainsi que des propriétés diélectriques du milieu environnant et des interactions inter-particules. Il est possible alors de jouer sur ces différents paramètres pour faire varier la couleur des nanoparticules d'or dans tout le domaine du visible, voire de déplacer la fréquence de résonance de plasmon dans le proche infrarouge.

- ✓ Les particules d'or jouent le rôle de nano-émetteur thermique. L'énergie lumineuse absorbée par les nanoparticules d'or à la fréquence de résonance de plasmon se transforme en chaleur : les électrons absorbent les photons et subissent des collisions, entre eux et avec les ions du réseau, ce qui provoque de l'agitation thermique. La température des particules augmente, parfois jusqu'à plusieurs centaines de degrés. Elle transmet la chaleur au

milieu. Des impulsions d'énergie de l'ordre du femto à la nanoseconde peuvent suffire à provoquer cet effet photo-thermique.

✓ La réactivité chimique des nanoparticules d'or et leurs propriétés d'adsorption de molécules sont directement liées à la surface des nanoparticules et en particulier aux différentes configurations possibles des atomes de surface. Généralement, lorsque la taille de la particule diminue, non seulement la proportion d'atomes de surface augmente par rapport aux atomes de volume, mais la proportion d'atomes de coin et d'arête augmente aussi alors que celle d'atomes de plan diminue.

✓ des changements dans les propriétés électroniques sont induits par la diminution de la taille des particules. Les particules perdent le caractère métallique et deviennent des semi- conducteurs. Ces changements sont d'autant plus importants que les particules d'or sont petites.

Toutes ces propriétés ont donné lieu à des applications diverses. Les nanoparticules sont utilisées comme des nano-émetteurs électromagnétiques pour la transmission de l'information. Elles sont utilisées dans certaines réactions de catalyse telles que l'oxydation du CO, la réduction des NOx et la décomposition des composés organique volatils pour la dépollution de l'air et de l'eau [84]. En médecine, les nanoparticules d'or ont favorisé l'évolution du domaine de l'imagerie [85] et du diagnostic [86,87]. En ce qui concerne les biocapteurs, les nanoparticules d'or jouent un rôle de plus en plus important aussi bien au niveau de leur miniaturisation que de l'élaboration de nouvelles stratégies d'immobilisation de biomolécules de reconnaissance, particulièrement les enzymes [88]. Elles offrent l'avantage d'être biocompatibles, non cytotoxiques, et facilement fonctionnalisables [89]. En général, les nanoparticules d'or minimisent le problème de diffusion, augmentent la surface de contact et la densité de greffage des biomolécules, maintiennent la stabilité et l'activité biologique de ces dernières, améliorent les transferts d'électrons, contribuant à l'augmentation de la sensibilité des biocapteurs élaborés. Ces aspects ont fait l'objet de plusieurs revues [80,90].

Les nanoparticules magnétiques

Ce sont des nanoparticules à base d'oxydes de fer. Leur synthèse a été largement étudiée. Il existe deux méthodes de synthèse : physiques et chimiques. La voie chimique est la plus courante car elle permet de contrôler finement la taille de ces particules et de produire des systèmes monodispersés en quantité importante et en absence de tensioactifs [91]. Toutefois, il est indispensable de contrôler certains paramètres, en particulier la température, le temps de chauffage, la force ionique et le pH [92].

En raison de leurs propriétés intéressantes telles que le super paramagnétisme, le rapport surface/volume élevé, la faible toxicité et la régénération facile sous des champs magnétiques externes [93,94], ces nanoparticules ont un énorme champ d'applications. On les trouve dans le traitement de l'environnement [95], l'utilisation biomédicale et la bio-ingénierie [96,97], et l'analyse des aliments [98]. L'intérêt s'est porté aussi vers l'incorporation de ces

particules magnétiques dans la conception des biocapteurs du fait des avantages qu'elles présentent en termes d'immobilisation de biomolécules et des performances analytiques résultants des biocapteurs (sensibilité, stabilité et possibilité de recyclage) [99–102].

Les nanotubes de carbone

Observés pour la première fois en 1991, les nanotubes se présentent comme des tubes creux concentriques avec un diamètre interne de l'ordre du nanomètre et une longueur de l'ordre de quelques micromètres. Ces structures allongées sont éventuellement fermées à leurs extrémités par des pentagones de carbone caractéristiques des fullerènes. On distingue deux types de nanotubes de carbone : les nanotubes de carbone mono-feuillets et les nanotubes de carbone multi-feuillets. Il existe aussi des nanotubes de carbone double-feuillets aux propriétés à mi-chemin entre les deux types précédents. Les nanotubes de carbone sont dotés d'une conductivité électrique et thermique remarquablement élevées. Leur usage a permis également une grande avancée technologique dans de nombreux domaines, que ce soit en électronique ou en médecine. Les nanotubes de carbone sont par ailleurs largement utilisés pour l'élaboration de capteurs [103,104, 82].

I.2. L'ochratoxine A

I.2.1. Généralités sur les mycotoxines

Le terme « mycotoxine » est apparu pour la première fois au début des années 1960 pour décrire les toxines impliquées dans une maladie, inconnue à l'époque, qui a tué près de 100 000 volailles en Angleterre. Rapidement, ce terme a été adopté pour désigner l'ensemble des métabolites secondaires produits naturellement par certaines moisissures. Les mycotoxines constituent un groupe très hétérogène du point de vue chimique. La seule caractéristique qui les regroupe est le fait qu'elles soient toxiques pour l'homme et l'animal [105]. Jusqu'à présent, environ 300 mycotoxines ont pu être identifiées, mais une vingtaine seulement fait l'objet d'un suivi particulier du fait du risque qu'elles font encourir à la santé humaine. On distingue essentiellement les aflatoxines, les ochratoxines, les fumonisines, les trichothécènes, la zéaralénone et la patuline. Ces mycotoxines se retrouvent à l'état de contaminants naturels de nombreuses denrées alimentaires telles que les céréales, les fruits, la viande, le café, le lait et ses dérivés... (Tab I.1). Leur toxicité se révèle variable, certaines exerçant un pouvoir hépatotoxique voire cancérogène (aflatoxines et ochratoxines), d'autres s'avérant oestrogéniques (zéaralénone) ou immunotoxiques (patuline, trichothécènes, fumonisines).

Tableau I.1. Principales moisissures, mycotoxines et denrées susceptibles d'être contaminées

Champignons	Toxines	Denrées alimentaires
<i>Aspergillus</i>	Aflatoxines Ochratoxines Stérigmatocystine	Céréales, viandes, cacahuète, haricots, graine de coton, lait et dérivés
<i>Fusarium</i>	Zéaralénone Fumonisines Trichothécènes	Blé, maïs, orge, riz, seigle, avoine...
<i>Penicillium</i>	Patuline Ochratoxines Citrinine Acide cyclopiazonique	Fruits et jus de fruits, blé, riz, fromage, noix...
<i>Alternaria</i>	Alternariol Acide ténuazonique	Fruits, légumes et produits dérivés de pommes et tomates
<i>Claviceps</i>	Alcaloïdes de l'ergot	Blé et dérivés, seigle....

I.2.2. Description de l'ochratoxine A

I.2.2.1. Structure et dérivés

Les ochratoxines constituent une famille de mycotoxines de structures chimiques proches. Elles comportent toutes une isocoumarine couplée à une molécule de L-phénylalanine par une liaison amide (Fig I.23), seuls les groupements R1, R2, R3 et R4 pouvant varier (Tab I.2). La molécule la plus toxique et fréquemment détectée de cette famille est l'ochratoxine A (OTA) [106,107] pour laquelle les groupements R1, R2, R3 et R4 sont respectivement Cl, H, H et H. L'OTA a été découverte en 1965 par Van der Merwe à l'occasion d'un « screening » sur les moisissures toxigènes [108]. Sa sécrétion s'accroît dans des conditions de température et d'humidité particulières. On la trouve le plus souvent dans les régions tempérées.

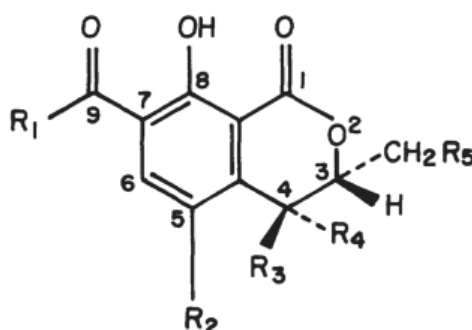


Figure I.23. Formule générale des ochratoxines [109]

Tableau I.2. Désignation des ochratoxines en fonction des différents groupements R1, R2, R3, R4 et R5 de la Fig I.23 [110].

Nom	R1	R2	R3	R4	R5
Ochratoxine A	Phénylalanine	Cl	H	H	H
Ochratoxine B	Phénylalanine	H	H	H	H
Ochratoxine C	Ester éthylique, Phénylalanine	Cl	H	H	H
Ester méthylique Ochratoxine A	Ester méthylique, Phénylalanine	Cl	H	H	H
Ester méthylique Ochratoxine B	Ester méthylique, Phénylalanine	H	H	H	H
Ester éthylique Ochratoxine B	Ester éthylique, Phénylalanine	H	H	H	H
Ochratoxine α	OH	Cl	H	H	H
Ochratoxine β	OH	H	H	H	H
4-R-hydroxyochratoxine A	Phénylalanine	Cl	H	OH	H
4-S-hydroxyochratoxine A	Phénylalanine	Cl	OH	H	H
10-hydroxyochratoxine A	Phénylalanine	Cl	H	H	OH
Analogue tyrosine de l'OTA	Tyrosine	Cl	H	H	H
Analogue sérine de l'OTA	Sérine	Cl	H	H	H
Analogue hydroxyproline de l'OTA	Hydroxyproline	Cl	H	H	H
Analogue lysine de l'OTA	Lysine	Cl	H	H	H

I.2.2.2. Propriétés physico-chimiques

L'OTA est une molécule soluble dans les solvants organiques polaires à pH acide ou neutre ainsi que dans les solutions aqueuses alcalines, mais elle est faiblement soluble dans l'eau. Son spectre d'absorption UV varie avec le pH et la polarité du solvant. Elle possède un maximum d'absorption à 333 nm avec un coefficient d'extinction molaire de $6400 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ dans le méthanol. Elle présente un maximum d'émission de fluorescence à 428 nm dans l'éthanol absolu. La particularité de l'OTA est sa stabilité élevée. Elle est résistante à l'acidité et aux hautes températures. Ainsi, une fois contaminées, les denrées alimentaires peuvent difficilement être débarrassées de cette molécule. Par ailleurs, la fermentation alcoolique semble inefficace dans la décontamination. Un grand pourcentage de l'OTA demeure après le traitement du malt lors de l'élaboration de la bière et la pasteurisation n'aboutit pas à sa destruction complète [111]. De plus, l'OTA peut résister pendant 3 heures à un autoclavage à 121°C [112]. Cependant une dégradation de l'OTA est observée lors d'un traitement en présence d'un excès d'hypochlorite de sodium (NaOCl 4%). Récemment, une autre alternative a été conçue pour la dégradation de l'OTA basée sur l'utilisation de microorganismes, en particulier des bactéries. Des résultats encourageants ont été obtenus [113]. Néanmoins, l'élimination complète de la molécule reste un objectif principal qui n'a pas encore été atteint.

I.2.3. Impacts sur l'homme

I.2.3.1. Données toxicologiques

L'OTA est une molécule toxique pour l'homme et les animaux, à la fois néphrologique, tératogène et immunosuppressive. Elle a été également classée en 1993 comme carcinogène du groupe 2B (IARC, 1993).

Néphrotoxicité : c'est l'effet toxique majeur de l'OTA. L'OTA est en particulier suspectée d'être la cause de la maladie humaine fatale connue sous le nom de néphropathie endémique des Balkans. Il s'agit d'une tubulonéphrite interstitielle chronique affectant la population dans certaines régions du Sud-Est européen (Croatie, Bosnie, Bulgarie et Roumanie) [114–116]. L'OTA a été également mise en cause dans la néphropathie tunisienne [117].

Génotoxicité : la preuve de la génotoxicité de l'OTA a été formellement démontrée par l'utilisation de systèmes in vivo. Des cassures de simple-brin ont été observées au niveau de l'ADN du rein, du foie et de la rate de rongeurs [118]. De plus, des aberrations chromosomiques ont été observées sur le chromosome X de lymphocytes humains cultivés en présence d'une faible concentration d'OTA [119].

Immunotoxicité : l'OTA et la 4R hydroxy-OTA sont les plus puissants immunosuppresseurs de la famille des ochratoxines. Ils affectent à la fois l'immunité humorale et l'immunité cellulaire. L'OTA entraîne une réduction de 90% du nombre de cellules produisant des immunoglobulines M (Ig M) et de 93% des cellules synthétisant des immunoglobulines G (Ig G). Pour sa part, la 4R hydroxy-OTA entraîne une diminution de 80% des cellules produisant des Ig M et de 93% de celles produisant des Ig G [120].

Tératogénicité : Plusieurs études ont montré que l'OTA peut traverser le placenta de l'animal et provoquer des anomalies morphologiques diverses chez les embryons de souris, de rats et de chevaux [121–123]. Chez l'Homme, l'exposition du fœtus a été mise en évidence par la détection de l'OTA dans le sang fœtal, dans le sang du cordon ombilical ainsi que dans le lait maternel [124].

Neurotoxicité : L'OTA est considérée depuis peu de temps comme une substance hautement neuro-toxique. Elle peut atteindre le tissu neural (cerveau, rétine) et induire des malformations du système nerveux central [125]. De plus, l'OTA semble contribuer à la pathogenèse de certaines maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer et de Parkinson [126].

Cancérogénicité : C'est dans les années 70 que l'hypothèse de la cancérogénicité de l'OTA a été proposée. Imaida et al. ont administré dans le régime alimentaire de quatre groupes de rats différentes doses de mycotoxines contenant 50 ppm d'OTA pendant 6 semaines. Ils ont montré que l'OTA présente l'effet cancérogène le plus puissant sur le foie et les reins des rats et augmente les domaines de nodules hyperplasiques ainsi que leur nombre [127]. Des études ultérieures ont confirmé l'effet cancérogène de l'OTA [128]. Mais ce n'est finalement qu'en 1993 que l'Agence Internationale de Recherche sur le Cancer a classé l'OTA comme une molécule cancérigène possible pour les humains (IARC, 1993). Au cours de ces dernières années, des recherches ont montré l'implication de l'OTA dans le déclenchement des hyperplasies, des proliférations cellulaires, des altérations cytoplasmiques, des karyomégalies au niveau des cellules tubulaires et des dégénérescences de l'épithélium tubulaire [129].

I.2.3.2. Contamination alimentaire

D'après le rapport annuel de RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed) diffusé en 2009, les mycotoxines seules constituent 36% de l'ensemble de la contamination alimentaire mondiale (Fig I.24).

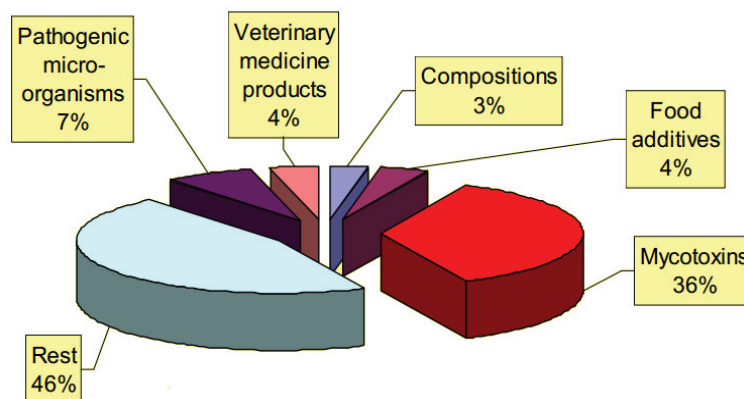


Figure I.24. Répartition des contaminants alimentaires (RASFF, 2009)

La contamination des denrées alimentaires par les mycotoxines en général, et par l'OTA en particulier, peut survenir avant, pendant et après la récolte aussi bien qu'au moment du stockage [130]. Une atmosphère humide et chaude favorise leur sécrétion [131]. Les céréales sont considérées comme des vecteurs de l'OTA car elles sont universellement consommées par l'homme et par les animaux. Des statistiques récentes ont montré que les consommateurs européens et canadiens adultes sont exposés à 15-60 ng d'OTA par kg de poids corporel et par semaine [132]. Dans les pays aux conditions climatiques chaudes et humides, où la croissance des champignons toxigènes est favorisée, l'occurrence de l'OTA dans les échantillons de céréales est plus élevée. Elle est estimée à 28 à 40 % en Tunisie [133,134]. L'OTA a été aussi détectée dans les fruits et les légumes [135], dans les viandes et les produits de charcuterie [136], dans le lait et ses dérivés [137] et dans d'autres produits tels que le cacao, les épices, les amandes, les raisins secs, les pistaches, les cacahuètes et le café [138].

Bien que les olives ne constituent pas un substrat oléagineux particulièrement favorable à la production de mycotoxines, les produits oléicoles peuvent néanmoins être susceptibles d'être contaminés. En effet, les conditions de stockage des olives (température et humidité élevées) sont des conditions propices au développement de moisissures [139]. En outre, les analyses de produits du commerce ont permis de mettre en évidence la contamination par l'aflatoxine B1 (AFB1) et l'OTA de quelques échantillons d'huile d'olive vierge [140,141]. Une étude menée sur une cinquantaine d'échantillons produits en Grèce entre 1998 et 2001, permet de disposer de données récentes et fiables [142]. La prépondérance de l'OTA y a été mise en évidence, cette toxine étant détectée dans 88 % des échantillons étudiés alors que l'AFB1 n'est présente que dans 12 % de ces mêmes échantillons. L'huile d'olive étant pratiquement la seule huile végétale pouvant être consommée directement et que sa consommation ne cesse d'augmenter (elle pourrait atteindre 172 millions de tonnes d'ici

2030 d'après les estimations de l'Agence Ecofin en 2012), la mise en place d'un plan de contrôle permettant de maintenir une surveillance active du secteur est indispensable.

I.2.3.3. Pertes économiques

Les mycotoxines constituent un sujet de préoccupation mondial en raison des pertes économiques importantes liées à leurs effets sur la santé de l'homme, la productivité animale et le commerce national et international. Il est très difficile d'évaluer de manière précise la perte économique due aux mycotoxines. Néanmoins, selon les récentes estimations de la FAO (Food and Agriculture Organization), 25% des cultures vivrières de la planète, y compris de nombreuses denrées de base, sont contaminées par des mycotoxines, ce qui représente des pertes totales de l'ordre de 1 000 millions de tonnes par an. Aux États-Unis, les pertes estimées dans les secteurs du blé et de l'orge sont d'environ 2900 millions de dollars par an et le retrait du marché des aliments contaminés en mycotoxines coûte de l'ordre de 342 millions de dollars annuellement [143]. Au Canada, les pertes dues à l'effet des mycotoxines sur les aliments du bétail et les industries de l'élevage sont de l'ordre de 5 milliards de dollars. La productivité des animaux dans la majorité des pays d'Amérique du Nord connaît des pertes énormes estimées à des milliards de dollars par année [144]. Dans les pays en voie de développement où l'alimentation est susceptible d'être contaminée par les mycotoxines, il faut y ajouter des pertes importantes dans la population humaine en raison de la morbidité et des décès prématurés [145].

En ce qui concerne la production d'huile d'olive, aucune donnée statistique n'est disponible. Les pays méditerranéens sont généralement les plus touchés par la qualité de l'huile d'olive car ils sont les plus gros consommateurs et également producteurs. Selon le FAO, l'Espagne, l'Italie et la Grèce sont les principaux pays européens producteurs d'huile d'olive. Ces 3 pays produisent la quasi-totalité de l'huile d'olive européenne (97%) et 70% de la production mondiale. La production moyenne de la Tunisie en représente 6%, ce qui lui confère le rang de cinquième producteur mondial (Fig I.25). Pour ces pays, la qualité de l'huile d'olive compte et sa contamination entraîne des pertes économiques inquiétantes.

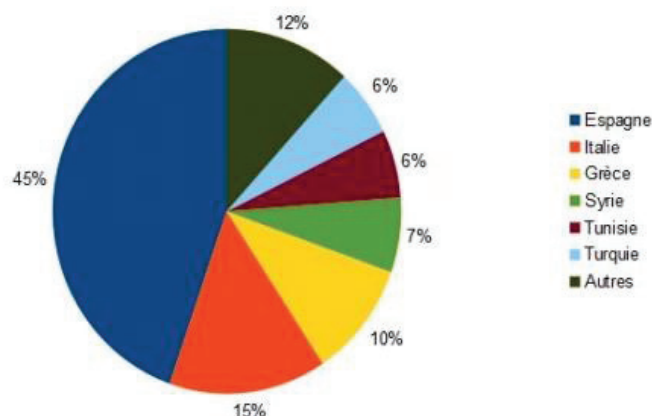


Figure I.25. Principaux pays producteurs d'huile d'olive dans le monde en 2012 (source agrivisio.com)

I.2.4. Réglementation et législation

L'Institut National pour la Santé Publique et l'Environnement a entamé, en 2002, une enquête internationale sur les mycotoxines. Les statistiques révèlent que 99 pays (près de 87% des habitants de la planète) disposaient de réglementations concernant les mycotoxines présentes dans les produits d'alimentation humaine et/ou animale, soit une hausse d'environ 30% par rapport à 1995 (Fig I.26).

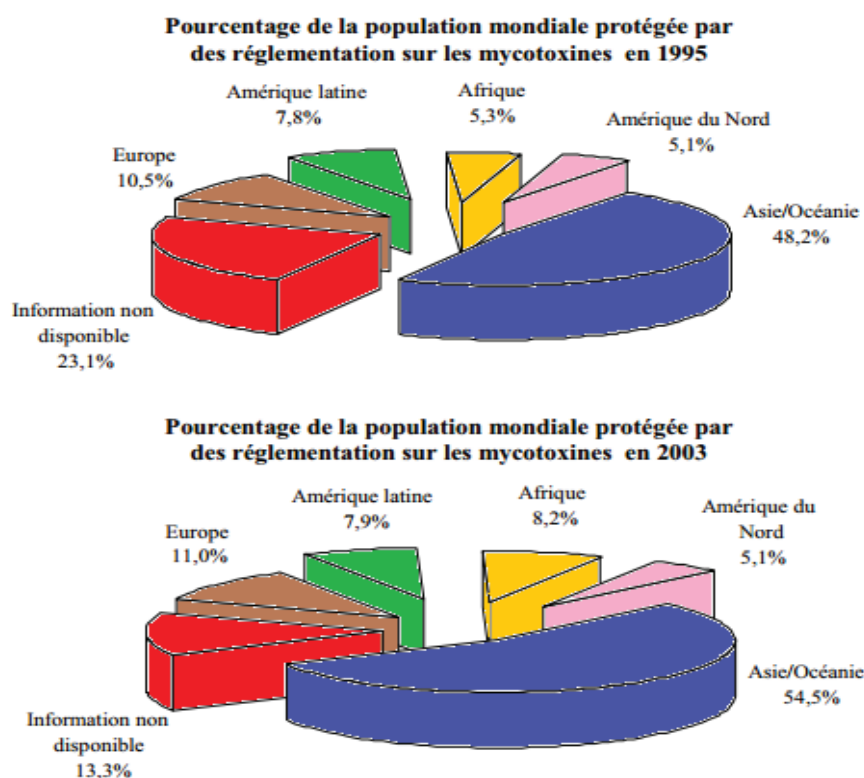


Figure I.26. Pourcentage de la population mondiale protégée par des réglementations sur les mycotoxines (FAO ISSN 1014-2908)

Concernant l'OTA, des mesures réglementaires ont été adoptées ou proposées dans au moins onze pays pour limiter les teneurs admises dans la nourriture humaine et animale. Pour l'alimentation humaine, dans le cadre du règlement 1881/2006/CE (abrogeant le règlement 466/2001/CE) portant sur la fixation de teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires, les teneurs maximales ont été fixées entre 0,5 et 15 µg/kg (Tab I.3).

Tableau I.3. Teneurs maximales en OTA dans quelques denrées alimentaires destinées à l'Homme, selon le règlement 466/2001/CE.

Matrice	Teneur maximale (µg/kg)
Grains de céréales brutes (y compris le riz brut et le sarrasin)	5
Produits dérivés des céréales (y compris les produits de céréales transformés et les grains de céréales destinés à la consommation directe)	3
Préparation à base de céréales pour enfants en bas âge et aliments diététiques destinés à des fins médicales spéciales spécifiquement pour les nourrissons	0,5
Raisins secs (Corinthe, sultanines et autres raisins secs)	10
Grains de café torréfié et café torréfié moulu	5
Vin (rouge, blanc et rosé) et autres boissons à base de vin et/ou de moût de raisins	2
Café soluble (instantané)	10
Mélanges d'épices	15
Jus de raisin, ingrédients à base de jus de raisin dans d'autres boissons, y compris le nectar de raisin et le jus de raisin concentré reconstitué	2

Concernant l'alimentation animale, aucune teneur maximale en OTA n'est encore fixée. Cependant, la commission (2006/576/CE) recommande d'appliquer des teneurs en OTA ne dépassant pas 250 µg/kg dans les matières premières (Tab I.4).

Tableau I.4. Teneurs maximales recommandées en OTA pour les produits destinés à l'alimentation animale, selon la recommandation 2006/576/CE.

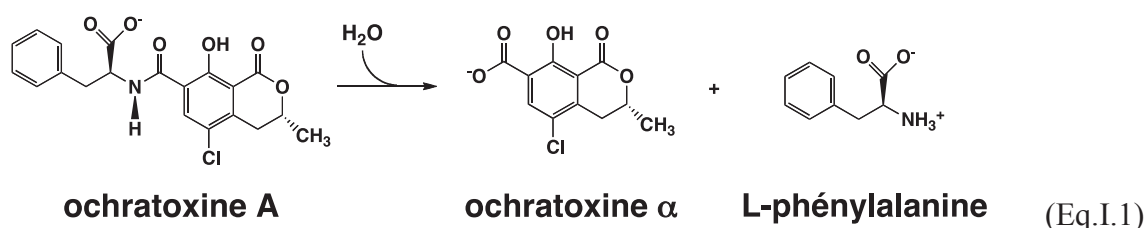
Matrice	Teneur maximale (µg/kg)
Matières premières entrant dans la composition des aliments pour animaux : céréales, produits et sous-produits de céréales et fourrages	250
Aliments complémentaires et complets pour : - les porcs - les volailles	50 100

Le comité mixte d'experts de l'OMS et de la FAO sur les additifs alimentaires recommande de limiter l'absorption hebdomadaire d'OTA à 100 ng/kg de poids corporel, ce qui correspond à une absorption journalière d'environ 14 ng/kg de poids corporel (JECFA, 1996a).

I.2.5. Méthodes de détoxification

Pour assurer la qualité et la sécurité alimentaire et minimiser le risque de contamination par l'OTA, plusieurs stratégies peuvent être employées. Certaines sont d'ordre préventif et reposent sur la maîtrise de certains facteurs importants permettant d'éviter les contaminations fongiques durant la récolte et/ou le stockage. Tout d'abord, l'intégrité physique des grains stockés doit être préservée. Le mélange de grains et un temps de stockage trop long doivent être par ailleurs évités. De plus, un contrôle des conditions de stockage

(séchage, température, humidité, oxygénation ...) est très important afin d'éviter la prolifération de microorganismes indésirables et l'éventuelle production de mycotoxines [146]. Le suivi des pratiques préventives ne suffit pas à éliminer totalement les risques de contamination. Il est donc nécessaire de disposer de méthodes de décontamination des matières premières. Ces méthodes reposent essentiellement sur la dégradation de l'OTA par voie thermique, par irradiation, ou par voie chimique [147]. Toutefois ces techniques ne sont pas toujours satisfaisantes et peuvent être à l'origine d'une altération de la qualité du produit ou de la persistance de résidus chimiques toxiques. Les méthodes biologiques constituent une alternative intéressante car elles préservent la qualité nutritive des aliments, ne génèrent pas de résidus toxiques et surtout ne modifient pas les propriétés du produit. Ces méthodes utilisent des microorganismes en tant que sources d'enzymes ou bien directement des enzymes purifiées capables de décomposer l'OTA en des molécules moins toxiques [148], par clivage de la liaison amide reliant la β -L-phénylalanine à l'OT α (Eq1).



De nombreux micro-organismes, principalement des bactéries, certains protozoaires et champignons sont capables d'effectuer cette réaction (Tab I.5).

Tableau I.5 : Quelques micro-organismes capables de dégrader l'OTA

Microorganismes	Référence
Bactéries	
<i>Bacillus subtilis</i> , <i>B. licheniformis</i>	[149]
<i>Lactobacillus</i> sp.	[150]
<i>Eubacterium callenderi</i> , <i>E. ramulus</i> , <i>Streptococcus pleomorphus</i> , <i>Lactobacillus vitullinus</i> , <i>Sphingomonas paucimobilis</i> , <i>S. saccharolytica</i> , <i>Stenotrophomonas nitritreducens</i> , <i>Ralstonia eutropha</i> , <i>R. basileensis</i> , <i>Ochrobactrum</i> sp., <i>Agrobacterium</i> sp.	[151]
Protozoaires	[152]
Champignons	
<i>Aspergillus niger</i> , <i>A. japonicus</i>	[153]
<i>Pleurotus ostreatus</i>	[154]
<i>Rhizopus stolonifer</i> , <i>R. microsporus</i> , <i>R. homothallicus</i> , <i>R. oryzae</i>	[155]
<i>Phaffia rhodozyma</i> , <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	[156]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Kloeckera apiculata</i>	[157]

Certaines enzymes isolées telles que les carboxypeptidases ou certaines hydrolases, dont des lipases, des protéases et l'ochratoxine ont été également étudiées pour leur capacité à dégrader l'OTA (Tab I.6).

Tableau I.6. Principales enzymes impliquées dans la dégradation de l'OTA

Enzymes	Référence
Carboxypeptidases A et Y	[147,158,159]
Pancréatine, Protéase A et Prolyse PAC	[160]
Amano A, crude lipase	[161]
Métalloenzyme hydrolytique de <i>A. niger</i>	[160]
Ochratoxine	[162]

I.2.6. Méthodes d'analyse de l'OTA

Il existe différentes techniques permettant l'analyse de l'OTA à l'état de traces dans les aliments. Elles peuvent être divisées en deux catégories : les méthodes quantitatives comme les chromatographies en phase liquide ou gazeuse, basées sur la séparation chromatographique des molécules suivie de leur détection par fluorimétrie ou spectrométrie de masse, et les méthodes rapides de criblage comme les méthodes immunologiques [163].

I.2.6.1. Méthodes chromatographiques

La chromatographie liquide haute performance (HPLC) est la méthode la plus utilisée pour la détermination de l'OTA. Elle a pu être validée au niveau international et est actuellement retenue dans la plupart des méthodes officielles. Elle fait l'objet de normes françaises (Afnor), européennes (EN) et internationales (ISO). Des limites de détection basses ($0,9 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, $2,5 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ et $4,6 \text{ ng kg}^{-1}$) ont pu être obtenues respectivement dans le blé et le maïs [164] et dans l'huile d'olive [142] grâce à un couplage à la spectroscopie de fluorescence. La combinaison de la HPLC avec la spectroscopie de masse seule (MS) ou en tandem (MS/MS) a également contribué à améliorer la quantification de l'OTA. Des résultats très reproductibles avec des limites de détection extrêmement basses ($0,6 \mu\text{g kg}^{-1}$ dans les céréales [165] et $0,0065 \mu\text{g l}^{-1}$ dans le café [166]) ont pu être atteints.

La chromatographie gazeuse (GC) constitue également une méthode intéressante pour l'analyse des mycotoxines volatiles. Elle convient plutôt à la classe des trichothécènes [167] [168].

De manière générale, ces techniques sont extrêmement sensibles et permettent l'analyse de l'OTA avec une grande précision. Toutefois, elles ont aussi leurs limitations. Elles sont lourdes à mettre en œuvre. En outre, elles nécessitent beaucoup de manipulations, incluant le prétraitement des échantillons (extraction et purification). De plus, elles sont très coûteuses à l'achat, en fonctionnement et en maintenance et elles exigent un personnel qualifié.

I.2.6.2. Méthodes immunochimiques

Les techniques immunochimiques reposent généralement sur l'utilisation d'un anticorps spécifique dirigé contre la molécule cible. Ces anticorps fixés sur un support inerte (tubes, puits, billes de verre, membranes) auront pour fonction de capturer les molécules de mycotoxines présentes dans le milieu réactionnel suite à une réaction d'interaction de type antigène-anticorps. La technique immunochimique la plus puissante est le test d'ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) [169]. Suivant la configuration de ce test, l'ajout d'un système enzymatique permettra de colorer le milieu réactionnel. La densité de la coloration mesurée sera proportionnelle ou bien inversement proportionnelle à la quantité de mycotoxine contenue dans l'échantillon. Le premier dosage immuno enzymatique de l'OTA dans des microplaques a été développé en 1981 par Pestka *et al.* [170]. Cependant, les réactivités croisées de l'anticorps par rapport aux autres ochratoxines n'étaient pas négligeables.

Depuis, différents types de kits d'ELISA ont été commercialisés pour la détection de l'OTA. Les kits les plus fréquents sont basés sur un format de dosage compétitif dans lequel l'antigène à doser entre en compétition avec l'antigène marqué pour la liaison à l'anticorps. Le complexe formé va par la suite interagir avec un substrat chromogène afin d'obtenir un signal mesurable. La performance de cette technique a été comparée à la HPLC pour étudier la prévalence de l'OTA dans diverses denrées alimentaires telles que l'orge, le blé, l'avoine, le maïs, le riz et les raisins secs. Les résultats obtenus ont été trouvés proches [171].

Quel que soit l'échantillon à analyser, l'ELISA de type compétitif constitue une alternative rapide, spécifique et simple à utiliser. Un des inconvénients de ces kits vient du fait qu'ils sont à usage unique, ce qui peut augmenter les coûts de dépistage à grande échelle. Cette technique possède par ailleurs une plage de détection limitée en raison de sa sensibilité étroite aux anticorps. De plus, en raison de la petite taille de l'OTA, le développement d'anticorps nécessite l'intégration d'une molécule de support, généralement, une protéine, pour obtenir l'immunogénicité. Ce processus de conjugaison peut être responsable d'une baisse de sélectivité [172].

D'autres formes d'ELISA ont été appliquées dans le dépistage de l'OTA. L'ELISA direct, par exemple, a servi à détecter l'OTA et d'autres mycotoxines dans des produits alimentaires de consommation courante en Croatie, où une maladie rénale chronique atteignait des proportions très élevées. Les niveaux de contamination trouvés dans ces produits étaient en dessous de la limite légale maximale recommandée mais l'OTA a été signalé comme susceptible d'être un facteur de risque potentiel pour cette néphropathie [173]. D'une manière générale, la technique ELISA employée dans l'analyse de l'OTA, qu'elle soit directe ou indirecte, offre des avantages mais également des limites. L'ELISA direct est rapide puisqu'un seul anticorps est utilisé et la réactivité croisée de l'anticorps secondaire, observée dans certains cas, est complètement éliminée. Cependant, l'immunoréactivité de l'anticorps primaire peut être réduite à la suite de l'amplification du signal. L'ELISA indirect, par sa part, est généralement plus sensible. Chaque anticorps primaire contient plusieurs épitopes qui peuvent être liés par des anticorps secondaires marqués permettant ainsi l'amplification du signal. Cependant, dans ce cas, une réactivité croisée peut se produire avec les anticorps secondaires et provoquer l'apparition de faux positifs qui entraînent une

surestimation des résultats [172]. Il est à signaler aussi que, comme toutes les autres méthodes, une étape de prétraitement de l'échantillon doit précéder l'analyse par ELISA.

Quelle que soit la méthode d'analyse évoquée précédemment, la matrice de l'échantillon constitue une forte contrainte surtout lorsqu'elle est complexe, comme c'est le cas de l'huile d'olive, matrice à base de matière grasse, à laquelle nous nous sommes intéressés dans ce travail.

La maîtrise de différents paramètres s'avère essentielle pour obtenir des résultats fiables tels que :

- ✓ la pureté des solvants utilisés.
- ✓ l'efficacité et la reproductibilité de l'étape d'extraction.
- ✓ la limitation des étapes d'évaporation.
- ✓ la résolution chromatographique.
- ✓ la spécificité du détecteur.

I.2.6.3. Biocapteurs

Parmi les autres techniques d'analyse des mycotoxines, en particulier de l'OTA, les biocapteurs ont été l'objet ces dernières années d'un intérêt particulier et apparaissent à présent comme des outils de screening à fort potentiel utilisables comme techniques complémentaires aux méthodes conventionnelles. Par ailleurs, leur rapidité de réponse, leur miniaturisation possible, leur facilité d'utilisation, leur faible coût et surtout leur haute sensibilité contribuent à la mise en place d'un système de dépistage fiable et simple.

Les aptacapteurs [160–173] et les immunocapteurs [174–182] sont les biocapteurs les plus généralement proposés pour la détection de l'OTA, quels que soient la matrice analysée ou le type de transducteur utilisé (optique [160-167, 174-176], électrochimique [168-173, 177-181] ou mécanique [182]). Toutefois, l'élaboration de ces biocapteurs est généralement fondée sur des architectures sophistiquées qui nécessitent l'emploi de composants coûteux, rendant difficilement envisageable la production en masse de ces dispositifs ainsi que leur utilisation pour l'analyse d'échantillons complexes et leur recyclage. Par comparaison, les enzymes ont été rarement exploitées, même si elles sont moins chères à produire et plus faciles à manipuler. Des biocapteurs enzymatiques basés sur des processus d'activation ou d'inhibition ont été rapportés pour d'autres mycotoxines [174] mais à notre connaissance, un seul biocapteur à base d'enzyme a été proposé pour la détection de l'OTA [175,176]. Le mode de détection utilisé est électrochimique (la chronoampérométrie) et les échantillons analysés sont la bière et le café. Dans ce travail, nous avons évalué la possibilité d'utiliser des peptidases (carboxypeptidase Y et thermolysine) comme éléments de reconnaissance pour le développement d'un biocapteur conductimétrique pour l'analyse de l'OTA.

I.3. Les peptidases

I.3.1. Généralités sur les enzymes

Comme brièvement présenté dans le paragraphe traitant de la classification des biorécepteurs, les enzymes sont définies comme des catalyseurs biologiques spécifiques à plusieurs points de vue :

- Une enzyme est d'un substrat ou de plusieurs substrats de structures voisines (stéréospécificité).
- En général, chaque enzyme ne catalyse qu'un seul type de réaction chimique (spécificité réactionnelle).
- Une enzyme peut être capable de catalyser la transformation de son substrat à une position précise de sa molécule (régiospécificité).

Il existe deux grandes catégories d'enzymes. Les enzymes purement protéiques qui ne sont constituées que d'acides aminés. Les autres, appelées holoenzymes sont constituées d'une partie protéique, l'apoenzyme, qui n'est pas fonctionnelle seule et d'une partie non protéique appelée cofacteur. Le cofacteur peut être un ion métallique comme le cuivre, le zinc, le manganèse ou une molécule organique appelée coenzyme (ex. : NAD) ou groupement prosthétique (ex. : hème), ce dernier étant fermement lié à la protéine.

Les enzymes présentent des points communs aussi bien que des différences avec les catalyseurs chimiques. En effet, comme les catalyseurs chimiques, les enzymes n'influencent pas la variation d'énergie libre de la réaction, elles ne catalysent donc que les réactions thermodynamiquement possibles. Elles augmentent la vitesse de la réaction en abaissant l'énergie d'activation des réactifs (appelés substrats dans le cas des enzymes). La vitesse d'une réaction catalysée par une enzyme est multipliée par un facteur 10^6 à 10^{12} par rapport à la même réaction réalisée en absence de catalyseur et elle est supérieure de plusieurs ordres de grandeur à celle obtenue avec un catalyseur chimique. Elles possèdent une plus grande spécificité vis-à-vis de leurs substrats que les catalyseurs chimiques. Ainsi, les réactions enzymatiques ne donnent que rarement des produits secondaires. Alors que les catalyseurs chimiques nécessitent souvent des températures et des pressions élevées ainsi que des pH extrêmes, les enzymes fonctionnent dans des conditions plus douces. Cependant elles sont plus sensibles à la dénaturation à cause de leur structure protéique.

I.3.1.1. Classification

Il existe deux types de nomenclature :

- Une nomenclature fonctionnelle qui fait apparaître dans le nom de l'enzyme le nom du substrat et le type de réaction catalysée

Exemple : la glucose oxydase

- Une nomenclature officielle : chaque enzyme est identifiée à l'aide d'un code commençant par EC (pour Enzyme Commission) et suivie de quatre nombres X_1 X_2 X_3 X_4 .

X_1 indique la classe de l'enzyme. Il en existe 6, suivant le type de réaction catalysée (Tab I.7)

Tableau I. 7. Nomenclature des enzymes et réactions correspondantes

EC 1	oxydoréductases	Transfert de protons et d'électrons
EC 2	transférases	Transfert d'un groupement fonctionnel
EC 3	hydrolases	Hydrolyse de liaisons esters, osidiques, peptidiques, ...
EC 4	lyases	Rupture d'une liaison par fixation ou départ d'un groupement chimique avec création d'une double liaison
EC 5	isomérases	Modification interne de la molécule
EC 6	ligases	Formation de liaisons C-O, C-S, C-N ou C-C nécessitant de l'énergie (ATP)

X_2 , et X_3 apportent en général une précision sur le type de réaction catalysée et sur le(s) substrat(s) de la réaction X_4 c'est le numéro d'ordre de l'enzyme.

Exemple :

EC 3 Hydrolases

EC 3.4. Peptidases (hydrolyse des liaisons peptidiques)

EC 3.4.24 Métalloendopeptidases (hydrolyse de liaisons peptidiques internes et présence d'un ion métallique dans le site catalytique)

EC 3.4.24.27 Thermolysine

I.3.1.2. Site actif

Dans les enzymes, se trouve une région particulière appelée site actif. Il s'agit d'une région bien déterminée qui joue un rôle direct dans l'activité enzymatique. Le site actif est constitué d'un petit nombre d'acides aminés qui le plus souvent ne se suivent pas dans la séquence polypeptidique. Cependant, le repliement de la protéine rapproche les chaînes latérales de ces acides aminés pour former une cavité qui renferme d'une part, le site de reconnaissance du substrat et d'autre part, le site catalytique où le substrat est transformé en produit(s) par réaction chimique. La spécificité de reconnaissance entre l'enzyme et le substrat et la réaction enzymatique sont basées sur des interactions entre les groupements chimiques des deux partenaires. Il s'établit principalement des liaisons non covalentes de types hydrogènes, électrostatiques ou hydrophobes, mais parfois aussi des liaisons covalentes.

I.3.1.3. Mécanismes de catalyse

Il existe plusieurs mécanismes de catalyse enzymatique. On distingue essentiellement :

Catalyse acide/base : L'enzyme fournit les groupes accepteurs et donneurs de protons. S'il s'agit d'un transfert partiel d'un proton à partir d'un groupe acide provoquant une baisse de l'énergie libre de la réaction, on parle d'une catalyse acide générale. Dans le cas contraire, où la vitesse de la réaction est augmentée par l'abstraction partielle d'un proton par une base on parle d'une catalyse basique générale. La réaction devient acide - base générale concertée lorsque les deux réactions sont simultanées.

Catalyse covalente : L'enzyme se combine de façon covalente avec le substrat pour former un intermédiaire permettant une réaction plus rapide

Catalyse métallo-dépendante : L'enzyme utilise des ions métalliques comme cofacteurs pour stabiliser différentes charges négatives qui peuvent apparaître en cours de réaction et pour ioniser les molécules d'eau afin de les rendre plus nucléophiles. Un très grand nombre d'enzymes sont dépendantes des ions métalliques pour leur catalyse. Elles se divisent en deux classes qui se distinguent par la force des interactions protéine - ion :

a) Métalloenzymes possédant des ions métalliques fortement liés comme Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} ou Co^{2+} .

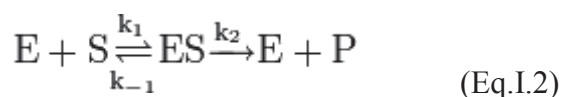
b) Des enzymes activées par des ions métalliques faiblement liés comme Na^+ , K^+ , Mg^{2+} ou Ca^{2+} .

Les ions métalliques participent à la catalyse principalement de trois façons : soit par orientation du substrat, soit par stabilisation électrostatique des charges négatives, soit par des changements réversibles de l'état d'oxydation de l'ion métallique dans le cas des réactions d'oxydo-réduction.

I.3.1.4. Cinétique enzymatique

La cinétique enzymatique a pour objet d'identifier et de décrire les mécanismes des réactions biochimiques, catalysées par les enzymes, en étudiant leur évolution en fonction du temps. Ces mesures peuvent nous informer sur les caractéristiques physico-chimiques de l'enzyme et sur sa spécificité vis-à-vis le substrat.

Dans le modèle généralement avancé pour décrire les cinétiques enzymatiques, la réaction globale comprend deux réactions élémentaires : le substrat forme d'abord un complexe avec l'enzyme, puis ce complexe se décompose en produit et enzyme (Eq.I.2).



où E, S, ES, et P symbolisent respectivement l'enzyme, le substrat, le complexe enzyme-substrat et le produit.

La vitesse de la réaction correspond à l'apparition du produit P (ou à la disparition du substrat S) au cours du temps. $v = \frac{d[P]}{dt}$ ou $v = -\frac{d[S]}{dt}$

Graphiquement, la vitesse est la pente de la tangente à la courbe à l'instant t. La portion linéaire de la courbe correspond à la vitesse initiale v_i de la réaction (Fig I.27).

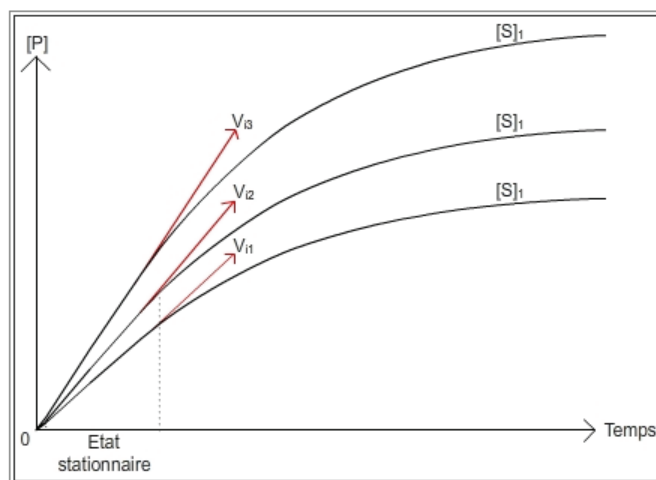
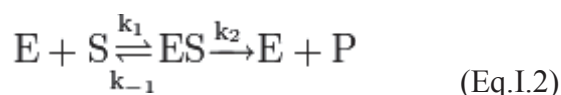


Figure I.27. Relation entre la vitesse et la concentration du substrat

Modèle de Michaelis-Menten

Il s'applique si les hypothèses suivantes sont vérifiées :

- [P] est négligeable, la formation du complexe ES à partir de E et P est négligeable et l'équation I.2 peut s'écrire :



- Il s'établit très rapidement un équilibre entre la formation et la disparition du complexe ES, c'est l'état stationnaire. La concentration du complexe ES reste constante :

$$d[ES] / dt = 0 \quad (\text{Eq.I.3})$$

- la concentration initiale en enzyme, $[E]_0$ est très faible par rapport à la concentration initiale de substrat, $[S]_0$ et $[E]_0 = [E] + [ES]$ (Eq.I.4)

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] \quad (\text{Eq.I.5})$$

La vitesse de formation du complexe ES est identique à sa vitesse de disparition :

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0 = k_1[E][S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] \quad (\text{Eq.I.6})$$

où $k_1 \cdot [E] \cdot [S] = k_{-1} \cdot [ES] + k_2 \cdot [ES]$

A partir de l'Eq.I.6 on peut écrire :

$$k_1 \cdot ([E]_0 - [ES]) \cdot [S] = k_{-1} \cdot [ES] + k_2 [ES]$$

$$\Leftrightarrow k_1 \cdot [E]_0 \cdot [S] = (k_{-1} + k_2 + k_1 \cdot [S]) [ES]$$

$$\Leftrightarrow [ES] = \frac{k_1 \cdot [E]_0 \cdot [S]}{k_{-1} + k_2 + k_1 \cdot [S]}$$

Si on définit la constante de Michaelis par : $K_M = (k_{-1} + k_2) / k_1$

$$\Leftrightarrow [ES] = \frac{[E]_0 \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad (\text{Eq.I.7})$$

La vitesse initiale peut alors s'écrire :

$$v_i = k_2 \cdot [ES] = k_2 \cdot [E]_0 \cdot [S] / (K_M + [S])$$

La vitesse maximale V_{\max} est obtenue lorsque la totalité de l'enzyme est sous forme de complexe ES et donc : $V_{\max} = k_2 \cdot [E]_0$

$$v_i = V_{\max} \cdot [S] / (K_M + [S]) \quad (\text{Eq.I.8})$$

Cette équation est connue sous le nom d'équation de Michaelis et Menten.

Pour les enzymes qui suivent le modèle de Michaelis-Menten, la représentation graphique de la vitesse initiale en fonction de la concentration du substrat décrite par l'équation I.8 est une hyperbole (Fig I.28).

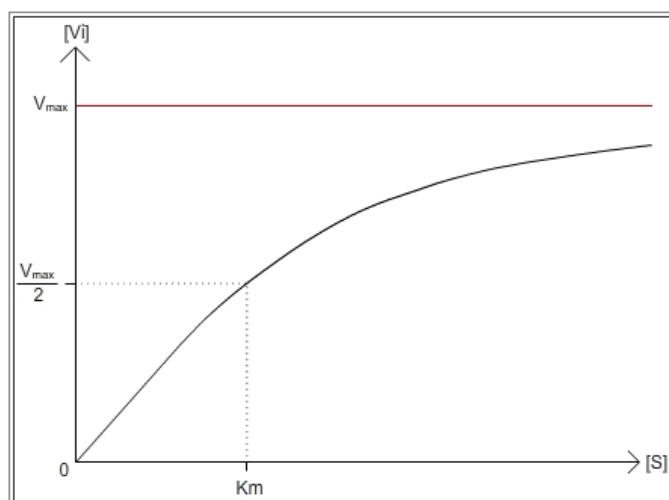


Figure I.28. Evolution de la vitesse de la réaction enzymatique en fonction de la concentration en substrat.

Paramètres cinétiques

Parmi les paramètres qui servent à caractériser les enzymes, évaluer leur spécificité et définir leur efficacité, on distingue :

- La constante de Michaelis-Menten (K_M) : est une mesure de l'affinité de l'enzyme pour son substrat. Cette valeur est la concentration de substrat capable de saturer la moitié des sites catalytiques de l'enzyme, c'est-à-dire lorsque la valeur de la vitesse initiale est égale à la moitié de celle de la vitesse maximale, $[S] = K_M$ quand $v_i = V_{\max}/2$. Plus K_M est élevé, plus l'affinité de l'enzyme pour le substrat est faible.
- La vitesse maximale (V_{\max}) : est la vitesse maximale atteinte par l'enzyme lorsque la concentration de substrat est suffisamment élevée pour saturer la totalité des sites catalytiques. $v_i = V_{\max}$ quand $[ES] = [E]_0$
- La constante catalytique (k_{cat}) : est une constante de vitesse du premier ordre. Elle représente la fréquence à laquelle l'enzyme accomplit l'acte catalytique. Plus cette valeur est grande, plus la catalyse est rapide.

Facteurs influençant l'activité enzymatique

La concentration en enzyme : lorsque la concentration de l'enzyme est inférieure à celle du substrat, la vitesse de la réaction est proportionnelle à la concentration de l'enzyme et elle augmente lorsque la concentration de l'enzyme augmente. Ceci est vrai pour n'importe quel catalyseur.

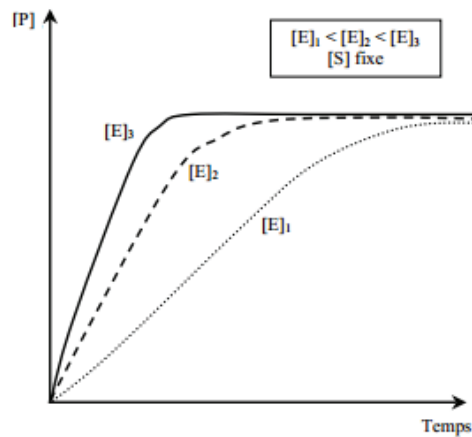


Figure I.29. Influence de la concentration en enzyme sur la cinétique d'apparition du produit

La concentration en substrat : le choix de la concentration du substrat est une considération importante dans le développement des essais enzymatiques. Pour une quantité fixe d'enzyme, la vitesse de la réaction est proportionnelle à la concentration du substrat dans la zone des faibles concentrations (Fig I.30). Par contre, à des concentrations de substrat élevées, la vitesse de la réaction est indépendante de la concentration et tend vers une valeur constante (vitesse maximale).

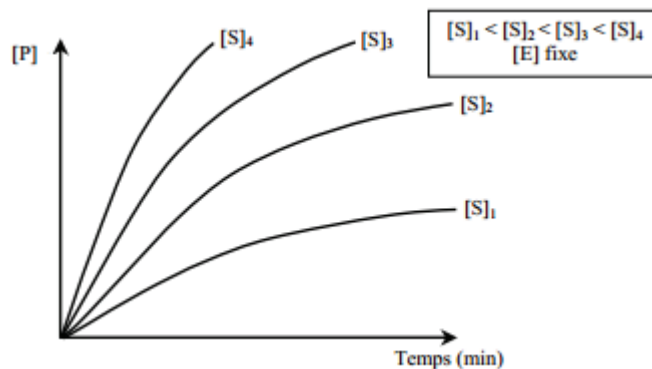


Figure I.30. Influence de la concentration en substrat sur la cinétique d'apparition du produit

Le pH : les enzymes sont sensibles aux variations de pH. Il existe une zone de pH pour laquelle l'activité enzymatique est maximale, on parle d'un pH optimum (Fig I.31). Pour la majorité d'entre elles, la réaction biologique se déroule à un pH neutre et beaucoup sont inactivées en dehors d'une gamme de pH compris entre 5 et 9. Par conséquent, le contrôle du pH au moyen d'une solution tampon est une nécessité lorsqu'on réalise un dosage enzymatique.

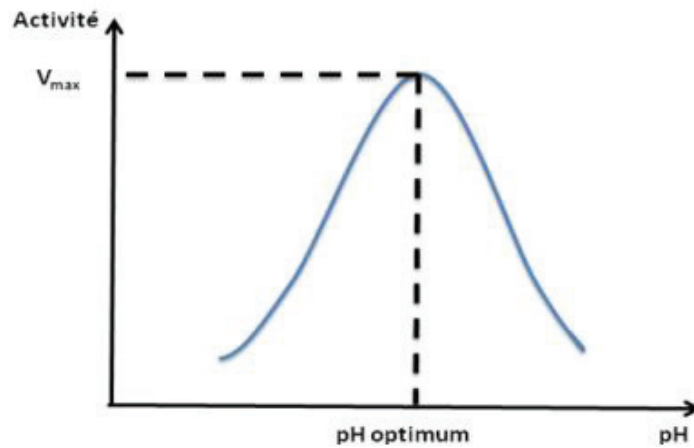


Figure I.31. Effet de pH sur l'activité enzymatique.

La température : comme pour le pH, il existe une zone optimale de température pour laquelle l'activité enzymatique est maximale. Cette variation est déterminée par la mesure de la variation de la vitesse de la réaction en fonction de la température du milieu. Elle résulte de deux effets antagonistes (Fig I.32).

✓ une augmentation de l'agitation des molécules avec l'élévation de la température entraînant l'accroissement de la fréquence de collisions entre le substrat et l'enzyme (zone A).

✓ une dénaturation de l'enzyme par la chaleur et par la suite son inactivation. Cette dénaturation modifie les structures tertiaire et quaternaire de la protéine en passant d'une conformation active à une conformation inactive (zone B).

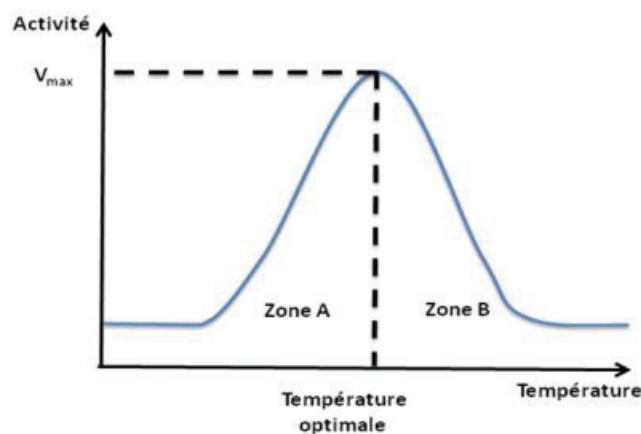


Figure I.32. Effet de la température sur l'activité enzymatique.

Les effecteurs :

Les effecteurs peuvent être de deux types différents :

✓ les inhibiteurs qui se lient à l'enzyme, provoquent une baisse de son activité, soit parce qu'ils se fixent au niveau du site actif à la place du substrat, soit parce qu'ils provoquent une déformation de l'enzyme. Dans certains cas, le mécanisme d'inhibition implique une réaction avec le substrat. L'inhibition enzymatique peut être réversible ou irréversible.

✓ les activateurs sont des molécules ou des ions qui s'associent à l'enzyme ou au complexe ES pour augmenter la vitesse des réactions enzymatiques. Ce sont en général des ions métalliques mais il peut également s'agir d'ions anti-inhibiteurs.

I.3.2. Les peptidases

I.3.2.1. Généralités

Les peptidases sont des enzymes qui brisent les liaisons peptidiques des protéines. On parle alors de coupure protéolytique ou de protéolyse. Ce processus implique l'utilisation d'une molécule d'eau ce qui les classe parmi les hydrolases (EC 3.4.).

On peut classer les peptidases en fonction de la nature du ou des acides aminés du site catalytique impliqué dans la catalyse. On distingue essentiellement quatre grandes familles (Tab I.8) :

- **Les peptidases à sérine** possèdent une triade catalytique caractéristique comprenant une sérine, une histidine et un aspartate. Le groupement hydroxyle de la sérine joue le rôle de nucléophile et attaque le carbonyle de la liaison peptidique.

- **Les peptidases à cystéine** possèdent une cystéine dans leur site actif. Dans ces protéases, le rôle du nucléophile est joué par le soufre de la cystéine, sous forme de thiolate déprotoné.

- **Les peptidases à aspartate** agissent à pH acide et possèdent un acide aspartique dans leur site actif.

- **Les métallo-peptidases** possèdent un cation métallique, en général un atome de zinc, fortement fixé à la protéine par les chaînes latérales de plusieurs acides aminés. Le cation métallique intervient directement pour activer une molécule d'eau qui clive la chaîne peptidique.

Au sein de chaque famille, il existe différentes classes fonctionnelles groupées en fonction de la position où a lieu la coupure dans la chaîne peptidique. On distingue ainsi :

- **Les exopeptidases** qui agissent à une extrémité de la chaîne peptidique.
 - Les aminopeptidases coupent entre le premier et le deuxième acide aminé de la chaîne, et libèrent donc l'acide aminé *N*-terminal.

- Les carboxypeptidases coupent entre l'avant dernier et le dernier acide aminé de la chaîne, et libèrent donc l'acide aminé C-terminal.

- **Les endopeptidases** qui agissent à l'intérieur de la chaîne peptidique.

La plupart des peptidases clivent préférentiellement la chaîne peptidique à des positions précises, en fonction de la nature des chaînes latérales des acides aminés qui entourent le site d'hydrolyse. Dans certains cas, cette spécificité est faible, mais dans d'autres, elle peut être élevée.

Tableau I.8. Quelques exemples des peptidases

Peptidase		Exemples
à sérine	endo	Chymotrypsine, Trypsine, ...
	exo	Carboxypeptidase Y , ...
métallopeptidase	endo	Thermolysine , ...
	exo	Carboxypeptidase A, Carboxypeptidase B, ...
à aspartate	endo	Pepsine, ...
à cystéine	endo	Papaïne, ...

La thermolysine et la carboxypeptidase Y seront les enzymes utilisées comme élément de biorecognition dans notre travail.

I.3.2.2. La thermolysine

La thermolysine (EC 3.4.24.27) est nommée aussi protéinase neutre ou thermoase. Elle fut isolée et purifiée par Endo en 1962 d'une souche bactérienne de *Bacillus proteolyticus* Rokko (Endo, 1962). La thermolysine (TLN) est extrêmement stable à 35°C et conserve 50% de son activité initiale après une heure de chauffage à 80°C en solution aqueuse [177]. En raison de sa stabilité thermique élevée et de sa spécificité de substrat, la TLN est un catalyseur utile dans la synthèse peptidique [178]. D'autres applications industrielles sont également possibles comme pour la synthèse des édulcorants artificiels comme l'aspartame [179].

La TLN a une masse moléculaire de 34 600 Da pour 316 acides aminés. Sa structure générale est composée de deux domaines grossièrement sphériques. La structure secondaire de chaque domaine est tout-à-fait différente. Le domaine N-terminal est essentiellement constitué de feuillets plissés bêta alors que le domaine C-terminal a une structure hélicoïdale. Ces deux domaines sont reliés par une hélice alpha centrale s'étendant entre les acides aminés 137-151 [180] (Fig I.33).

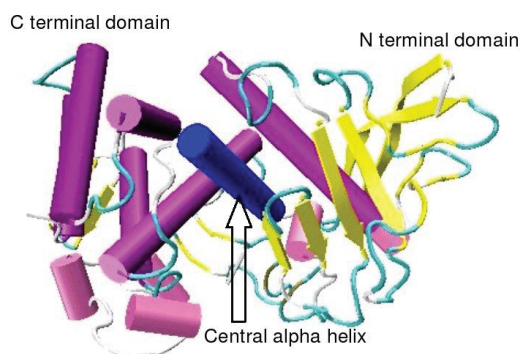


Figure I.33. Structure cristallographique de la thermolysine (Protein Data Bank « PDB » 3TMN)

La TLN est une métalloprotéinase neutre qui nécessite quatre ions calcium pour sa stabilité structurale et un ion zinc pour son activité enzymatique [181,182]. En effet, elle utilise le métal coordonné (Zn^{2+}) dans son mécanisme catalytique. La coordination s'effectue avec les chaînes latérales de deux histidines (H142 et H146) et d'un acide glutamique (D166). Une molécule d'eau est un ligand supplémentaire du zinc. Cette molécule d'eau établit une liaison hydrogène avec un acide glutamique (D143) qui lui arrache un proton et permet ainsi l'attaque nucléophile du carbonyle du substrat (Fig I.34).

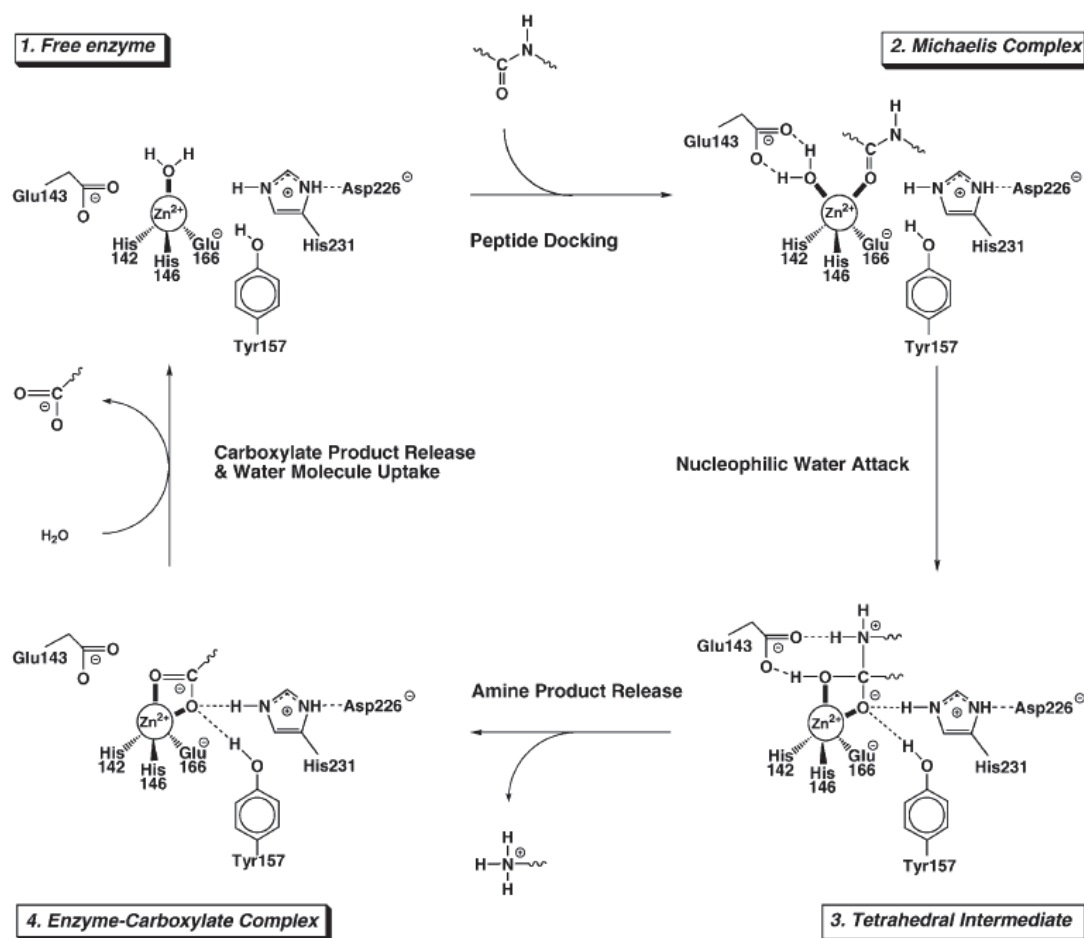


Figure I.34. Mécanisme catalytique de la thermolysine [183].

Des études sur la spécificité de substrat de la thermolysine ont été principalement menées par Morihara et Tsuzuki qui ont démontré que la thermolysine est une endopeptidase qui hydrolyse préférentiellement les liaisons peptidiques impliquant les groupements amines des résidus hydrophobes ayant des chaînes latérales volumineuses, telles que l'isoleucine, la leucine, la valine et la phénylalanine [184]. La dégradation de certains oligopeptides et d'autres substrats synthétiques par la TLN a été rapportée [185]. Cependant, les capacités de cette enzyme à hydrolyser l'OTA n'ont jamais été étudiées.

I.3.2.3. La carboxypeptidase Y

En 1967, la carboxypeptidase Y (EC 3.4.16.5), isolée à partir de la levure *Saccharomyces cerevisiae*, a d'abord été désignée sous le nom de protéinase C et c'est en 1970, que Hayashi *et al.* l'ont classée comme une peptidase à sérine [186]. Wolf et Fink ont découvert en 1975 son gène de structure [187]. Ce dernier a été confirmé plus tard par Hemmings *et al.* en 1981 [188]. En 1994, la structure cristalline a été résolue par Endrizzi *et al.* décelant quatorze hélices, onze feuillets β , cinq ponts disulfures, et un résidu cystéine libre [189] (Fig I.35).

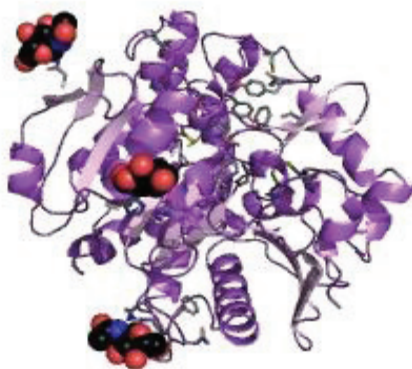


Figure I.35. Structure cristallographique de la carboxypeptidase Y (PDB 1cpy)

Contrairement aux carboxypeptidases A et B, la CPY ne contient pas d'ion métallique dans son site catalytique. Elle est glycosylée à quatre positions, et contient 15% de mannose. Certaines des chaînes glucidiques sont phosphorylées [190,191]. La CPY a été largement utilisée pour le séquençage des peptides et des protéines [192]. Sa masse molaire est de 64 000 Da pour 532 résidus d'acides aminés. Une caractéristique unique de la CPY, qui la distingue des autres protéases à sérine, est que son activité est optimale pour une large gamme de pH et que son activité est particulièrement élevée à pH acide [193]. Les inhibiteurs habituels des protéases à sérine, dont le diisopropyl fluorophosphate et le 4-hydroxymercuribenzoate, inhibent aussi l'activité de la CPY. La CPY est également sensible aux ions métalliques tels que Cu^{2+} , Hg^{2+} et Ag^{+} [194]. Toutefois, l'enzyme est relativement stable en présence d'agents dénaturants des protéines ou de certains solvants [195].

Le mécanisme catalytique de CPY est celui des protéases à sérine. L'hydrolyse se fait en deux étapes : l'acylation et la désacylation (Fig I.36). Dans la première réaction, un intermédiaire tétraédrique est formé suite à l'attaque nucléophile de l'hydroxyle de la sérine sur le carbonyle du substrat. Le résidu histidine contribue dans cette étape en acceptant le proton de l'hydroxyle de la sérine afin de renforcer son caractère nucléophile. Ce proton est ensuite transféré au groupement NH de la liaison peptidique, qui est alors libre de se dissocier. L'hydrolyse de l'acyl-enzyme libère, enfin, le second produit dans l'étape de désacylation. (Fig I.36).

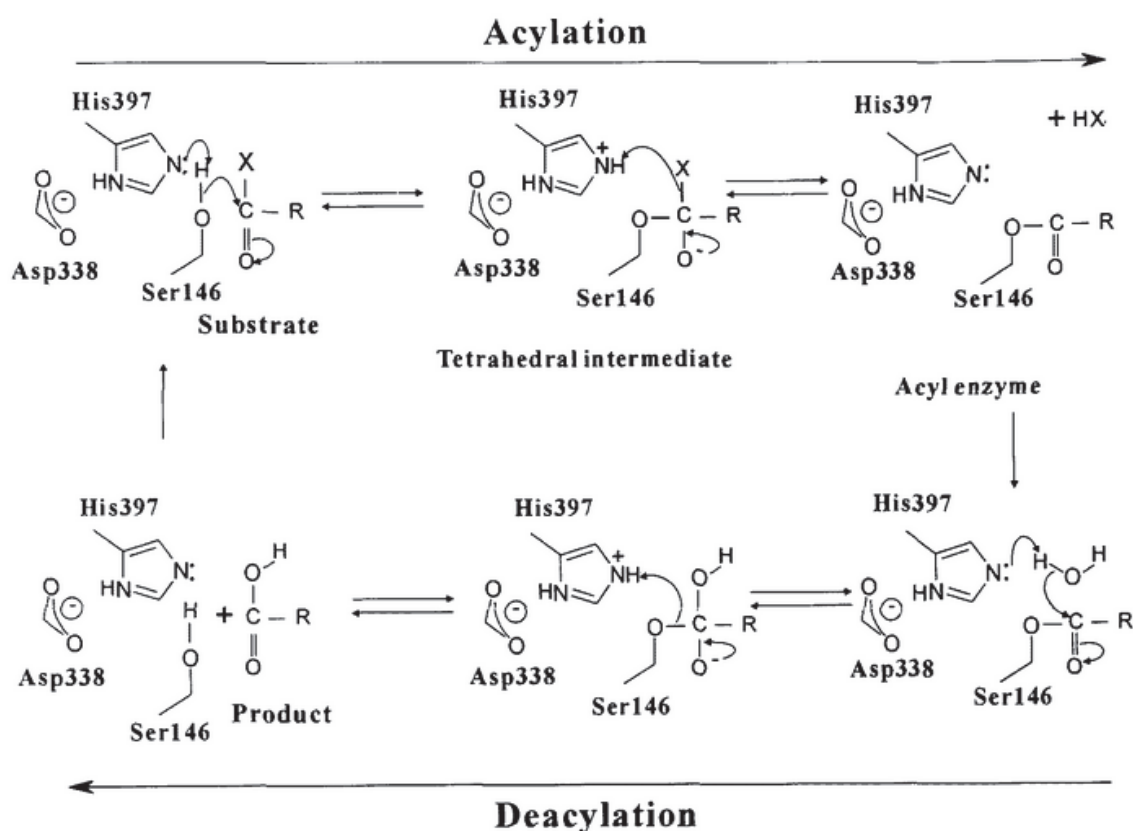


Figure I.36. Mécanisme catalytique de la carboxypeptidase Y [193].

Membre de la famille des carboxypeptidases, La CPY hydrolyse les polypeptides en enlevant les acides aminés un par un à partir de l'extrémité C-terminale. Cette enzyme possède une large spécificité de substrat. Cependant, elle montre une préférence pour les acides aminés hydrophobes dans la position P1' du substrat [196] ce qui serait approprié à l'hydrolyse de l'OTA qui contient de la phénylalanine dans sa structure. La biodégradation de l'OTA par la CPY a été rapportée [147] et ses constantes cinétiques ont été déterminées pour une série de dipeptides acylés et d'autres substrats synthétiques, y compris les amides et les esters [196,197]. Néanmoins, ces capacités à dégrader l'OTA n'ont jamais été exploitées pour le développement de biocapteurs.

Références

- [1] L.C. Clark, C. Lyons, Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 102 (1962) 29–45.
- [2] S.J. Updike, G.P. Hicks, The enzyme electrode, *Nature*. 214 (1967) 986–988.
- [3] G.G. Guilbault, J.G. Montalvo, A urea-specific enzyme electrode, *J. Am. Chem. Soc.* 91 (1969) 2164–2165.
- [4] Y.J. Heo, S. Takeuchi, Towards smart tattoos: implantable biosensors for continuous glucose monitoring, *Adv. Healthc. Mater.* 2 (2013) 43–56.
- [5] E.B. Bahadır, M.K. Sezgintürk, Applications of commercial biosensors in clinical, food, environmental, and biothreat/biowarfare analyses, *Anal. Biochem.* 478 (2015) 107–120.
- [6] E. Burcu Bahadır, M. Kemal Sezgintürk, Applications of electrochemical immunosensors for early clinical diagnostics, *Talanta*. 132 (2015) 162–174.
- [7] M.L.Y. Sin, K.E. Mach, P.K. Wong, J.C. Liao, Advances and challenges in biosensor-based diagnosis of infectious diseases, *Expert Rev. Mol. Diagn.* 14 (2014) 225–244.
- [8] S. Rodriguez-Mozaz, M.J.L. de Alda, D. Barceló, Biosensors as useful tools for environmental analysis and monitoring, *Anal. Bioanal. Chem.* 386 (2006) 1025–1041.
- [9] L. Barthelmebs, C. Calas-Blanchard, G. Istamboulie, J.-L. Marty, T. Noguer, Biosensors as analytical tools in food fermentation industry, *Adv. Exp. Med. Biol.* 698 (2010) 293–307.
- [10] N.A. Mungroo, S. Neethirajan, Biosensors for the detection of antibiotics in poultry industry-a review, *Biosensors*. 4 (2014) 472–493.
- [11] A.M. Skelley, J.R. Scherer, A.D. Aubrey, W.H. Grover, R.H.C. Ivester, P. Ehrenfreund, FJ Grunthaner, JL Bada, RA Mathies, Development and evaluation of a microdevice for amino acid biomarker detection and analysis on Mars, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (2005) 1041–1046.
- [12] T.B. Tims, D.V. Lim, Rapid detection of *Bacillus anthracis* spores directly from powders with an evanescent wave fiber-optic biosensor, *J. Microbiol. Methods*. 59 (2004) 127–130.
- [13] J.P. Chambers, B.P. Arulanandam, L.L. Matta, A. Weis, J.J. Valdes, Biosensor recognition elements, *Curr. Issues Mol. Biol.* 10 (2008) 1–12.
- [14] A. Killard, Antibodies: production, functions and applications in biosensors, *TrAC Trends Anal. Chem.* 14 (1995) 257–266.
- [15] J. Bockaert, J.P. Pin, Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success, *EMBO J.* 18 (1999) 1723–1729.
- [16] S. Rodriguez-Mozaz, M.-P. Marco, M.J. Lopez de Alda, D. Barceló, Biosensors for environmental monitoring of endocrine disruptors: a review article, *Anal. Bioanal. Chem.* 378 (2004) 588–598.
- [17] K. Miyano, Y. Sudo, A. Yokoyama, K. Hisaoka-Nakashima, N. Morioka, M. Takebayashi, Y Nakata, Y Higami, Y Uezono, History of the G Protein-Coupled Receptor (GPCR) Assays From Traditional to a State-of-the-Art Biosensor Assay, *J. Pharmacol. Sci.* 126 (2014) 302–309.
- [18] S. Cagnin, M. Caraballo, C. Guiducci, P. Martini, M. Ross, M. SantaAna, [Danley D, West T, Lanfranchi G](#), Overview of Electrochemical DNA Biosensors: New Approaches to Detect the Expression of Life, *Sensors*. 9 (2009) 3122–3148.
- [19] A.A. Ensafi, M. Taei, H.R. Rahmani, T. Khayamian, Sensitive DNA impedance biosensor for detection of cancer, chronic lymphocytic leukemia, based on gold nanoparticles/gold modified electrode, *Electrochimica Acta*. 56 (2011) 8176–8183.

- [20] M. Tichoniuk, D. Gwiazdowska, M. Ligaj, M. Filipiak, Electrochemical detection of foodborne pathogen *Aeromonas hydrophila* by DNA hybridization biosensor, *Biosens. Bioelectron.* 26 (2010) 1618–1623.
- [21] M.D. Carlo, M.D. Marcello, M. Perugini, V. Ponzielli, M. Sergi, M. Mascini, Dario Compagnone, Electrochemical DNA biosensor for polycyclic aromatic hydrocarbon detection, *Microchim. Acta.* 163 (2008) 163–169.
- [22] A.M. Nowicka, A. Kowalczyk, Z. Stojek, M. Hepel, Nanogravimetric and voltammetric DNA-hybridization biosensors for studies of DNA damage by common toxicants and pollutants, *Biophys. Chem.* 146 (2010) 42–53.
- [23] A. Mulchandani, null Rajesh, Microbial biosensors for organophosphate pesticides, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 165 (2011) 687–699.
- [24] L. Su, W. Jia, C. Hou, Y. Lei, Microbial biosensors: a review, *Biosens. Bioelectron.* 26 (2011) 1788–1799. d
- [25] W. Zhou, P.-J.J. Huang, J. Ding, J. Liu, Aptamer-based biosensors for biomedical diagnostics, *The Analyst.* 139 (2014) 2627–2640.
- [26] A. Rhouati, C. Yang, A. Hayat, J.-L. Marty, Aptamers: a promising tool for ochratoxin A detection in food analysis, *Toxins.* 5 (2013) 1988–2008.
- [27] S. Amaya-González, N. de-los-Santos-Alvarez, A.J. Miranda-Ordieres, M.J. Lobo-Castañón, Aptamer-based analysis: a promising alternative for food safety control, *Sensors.* 13 (2013) 16292–16311.
- [28] C.R.T. Tarley, L.T. Kubota, Molecularly-imprinted solid phase extraction of catechol from aqueous effluents for its selective determination by differential pulse voltammetry, *Anal. Chim. Acta.* 548 (2005) 11–19.
- [29] X.-D. Wang, O.S. Wolfbeis, Fiber-optic chemical sensors and biosensors (2008-2012), *Anal. Chem.* 85 (2013) 487–508.
- [30] H.H. Nguyen, J. Park, S. Kang, M. Kim, Surface plasmon resonance: a versatile technique for biosensor applications, *Sensors.* 15 (2015) 10481–10510.
- [31] X. Guo, Surface plasmon resonance based biosensor technique: a review, *J. Biophotonics.* 5 (2012) 483–501.
- [32] B. Becker, M.A. Cooper, A survey of the 2006-2009 quartz crystal microbalance biosensor literature, *J. Mol. Recognit. JMR.* 24 (2011) 754–787.
- [33] K. Mosbach, Thermal biosensors, *Biosens. Bioelectron.* 6 (1991) 179–182.
- [34] N.J. Ronkainen, H.B. Halsall, W.R. Heineman, Electrochemical biosensors, *Chem. Soc. Rev.* 39 (2010) 1747–1763.
- [35] J.C. Vidal, L. Bonel, A. Ezquerra, S. Hernández, J.R. Bertolín, C. Cubel, JR Castillo, Electrochemical affinity biosensors for detection of mycotoxins: A review, *Biosens. Bioelectron.* 49 (2013) 146–158.
- [36] D. Grieshaber, R. MacKenzie, J. Vörös, E. Reimhult, Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures, *Sensors.* 8 (2008) 1400–1458.
- [37] S.V. Dziadevych, O.P. Soldatkin, [A conductometric method of measuring enzymatic catalysis], *Ukr. Biokhimicheskii Zhurnal* 1978. 66 (1994) 30–42.
- [38] C. Chouteau, S. Dziadevych, C. Durrieu, J.-M. Chovelon, A bi-enzymatic whole cell conductometric biosensor for heavy metal ions and pesticides detection in water samples, *Biosens. Bioelectron.* 21 (2005) 273–281.
- [39] N. Tekaya, O. Saiapina, H. Ben Ouada, F. Lagarde, H. Ben Ouada, N. Jaffrezic-Renault, Ultra-sensitive conductometric detection of pesticides based on inhibition of esterase activity in *Arthrospira platensis*, *Environ. Pollut. Barking Essex* 1987. 178 (2013) 182–188.
- [40] M.A.T. Phuong Dinh Tam, Facile preparation of a DNA sensor for rapid herpes virus detection, *Mater. Sci. Eng. C.* 30 (2010) 1145–1150.

- [41] M. Hnaïen, W.M. Hassen, A. Abdelghani, C. Fournier-Wirth, J. Coste, F. Bessueille, D. Leonard, N. Jaffrezic-Renault, A conductometric immunosensor based on functionalized magnetite nanoparticles for *E. coli* detection, *Electrochem. Commun.* 10 (2008) 1152–1154.
- [42] Z.Q. Yan Liu, Immune-biosensor for aflatoxin B1 based bio-electrocatalytic reaction on micro-comb electrode, *Biochem. Eng. J.* (2006) 211–217.
- [43] C.O. Parker, Y.H. Lanyon, M. Manning, D.W.M. Arrigan, I.E. Tothill, Electrochemical immunoassay sensor for aflatoxin M1 detection, *Anal. Chem.* 81 (2009) 5291–5298.
- [44] A.-E. Radi, X. Muñoz-Berbel, V. Lates, J.-L. Marty, Label-free impedimetric immunosensor for sensitive detection of ochratoxin A, *Biosens. Bioelectron.* 24 (2009) 1888–1892.
- [45] C. Wu, H. Sun, Y. Li, X. Liu, X. Du, X. Wang, Xu P, Biosensor based on glucose oxidase-nanoporous gold co-catalysis for glucose detection, *Biosens. Bioelectron.* 66 (2015) 350–355.
- [46] A. Hierlemann, O. Brand, C. Hagleitner, H. Baltes, Microfabrication techniques for chemical/biosensors, *Proc. IEEE.* 91 (2003) 839–863.
- [47] S. Zhang, G. Wright, Y. Yang, Materials and techniques for electrochemical biosensor design and construction, *Biosens. Bioelectron.* 15 (2000) 273–282.
- [48] P. van Gerwen, W. Laureyn, W. Laureys, G. Huyberechts, M. Op de Beeck, K. Baert, et J.Suis, Nanoscaled interdigitated electrode arrays for biochemical sensors, *Sens. Actuators B Chem.* 49 (1998) 73–80.
- [49] S.B. Nimse, K. Song, M.D. Sonawane, D.R. Sayyed, T. Kim, Immobilization Techniques for Microarray: Challenges and Applications, *Sensors.* 14 (2014) 22208–22229.
- [50] S. Datta, L.R. Christena, Y.R.S. Rajaram, Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials, *3 Biotech.* 3 (2013) 1–9.
- [51] A. Sassolas, L.J. Blum, B.D. Leca-Bouvier, Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors, *Biotechnol. Adv.* 30 (2012) 489–511.
- [52] I. Migneault, C. Dartiguenave, M.J. Bertrand, K.C. Waldron, Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking, *BioTechniques.* 37 (2004) 790–802.
- [53] V.I.A. David R. Walt, The Chemistry of enzyme and protein immobilization with glutaraldehyde, *TrAC Trends Anal. Chem.* 13 (1994) 425–430.
- [54] M.-C. Radulescu, B. Bucur, M.-P. Bucur, G.L. Radu, Bionzymatic biosensor for rapid detection of aspartame by flow injection analysis, *Sensors.* 14 (2014) 1028–1038.
- [55] M. Sheliakina, V. Arkhypova, O. Soldatkin, O. Saiapina, B. Akata, S. Dzyadevych, Urease-based ISFET biosensor for arginine determination, *Talanta.* 121 (2014) 18–23.
- [56] M. Ates, A review study of (bio)sensor systems based on conducting polymers, *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 33 (2013) 1853–1859.
- [57] D. Bélanger, J. Nadreau, G. Fortier, Electrochemistry of the polypyrrole glucose oxidase electrode, *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* 274 (1989) 143–155.
- [58] M. Hasanzadeh, N. Shadjou, M. de la Guardia, Electrochemical biosensing using hydrogel nanoparticles, *TrAC Trends Anal. Chem.* 62 (2014) 11–19.
- [59] M. Yuqing, C. Jianrong, W. Xiaohua, Using electropolymerized non-conducting polymers to develop enzyme amperometric biosensors, *Trends Biotechnol.* 22 (2004) 227–231.
- [60] C. Malitesta, F. Palmisano, L. Torsi, P.G. Zambonin, Glucose fast-response amperometric sensor based on glucose oxidase immobilized in an electropolymerized poly(o-phenylenediamine) film, *Anal. Chem.* 62 (1990) 2735–2740.

- [61] Z. Zhang, H. Liu, J. Deng, A Glucose Biosensor Based on Immobilization of Glucose Oxidase in Electropolymerized o-Aminophenol Film on Platinized Glassy Carbon Electrode, *Anal. Chem.* 68 (1996) 1632–1638.
- [62] C. Knierim, M. Enzeroth, P. Kaiser, C. Dams, D. Nette, A. Seubert, Klingl A, Greenblatt CL, Jérôme V, Agarwal S, Freitag R, Greiner A, Living Composites of Bacteria and Polymers as Biomimetic Films for Metal Sequestration and Bioremediation, *Macromol. Biosci.* (2015).
- [63] X.-P. Liu, Y.-J. Deng, X.-Y. Jin, L.-G. Chen, J.-H. Jiang, G.-L. Shen, Jiang JH, Shen GL, Yu RQ, Ultrasensitive electrochemical immunosensor for ochratoxin A using gold colloid-mediated hapten immobilization, *Anal. Biochem.* 389 (2009) 63–68.
- [64] R.K. Mishra, R.B. Dominguez, S. Bhand, R. Muñoz, J.-L. Marty, A novel automated flow-based biosensor for the determination of organophosphate pesticides in milk, *Biosens. Bioelectron.* 32 (2012) 56–61.
- [65] A.L. Simonian, E.I. Rainina, V.I. Lozinsky, I.E. Badalian, G.E. Khachatryan, S.S. Tatikian, Makhlis TA, Varfolomeyev SD., A biosensor for L-proline determination by use of immobilized microbial cells, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 36 (1992) 199–210.
- [66] H. Kobayashi, Y. Ikada, Covalent immobilization of proteins on to the surface of poly(vinyl alcohol) hydrogel, *Biomaterials.* 12 (1991) 747–751.
- [67] B. Xue, Y. Sun, Protein adsorption equilibria and kinetics to a poly(vinyl alcohol)-based magnetic affinity support, *J. Chromatogr. A.* 921 (2001) 109–119.
- [68] Y.N. Martínez, I. Cavello, S. Cavalitto, A. Illanes, G.R. Castro, Studies on PVA pectin cryogels containing crosslinked enzyme aggregates of keratinase, *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 117 (2014) 284–289.
- [69] U. Lad, G.M. Kale, R. Bryaskova, Glucose oxidase encapsulated polyvinyl alcohol-silica hybrid films for an electrochemical glucose sensing electrode, *Anal. Chem.* 85 (2013) 6349–6355.
- [70] Y. Liu, J. Qian, X. Fu, H. Liu, J. Deng, T. Yu, Immobilization of horseradish peroxidase onto a composite membrane of regenerated silk fibroin and polyvinyl alcohol and its application to a new methylene blue-mediating sensor for hydrogen peroxide, *Enzyme Microb. Technol.* 21 (1997) 154–159.
- [71] H.-M. Jan, M.-F. Wei, C.-L. Peng, S.-J. Lin, P.-S. Lai, M.-J. Shieh, The use of polyethylenimine-DNA to topically deliver hTERT to promote hair growth, *Gene Ther.* 19 (2012) 86–93.
- [72] G. Lin, W. Zhu, L. Yang, J. Wu, B. Lin, Y. Xu, Cheng Z1, Xia C, Gong Q, Song B, Ai H, Delivery of siRNA by MRI-visible nanovehicles to overcome drug resistance in MCF-7/ADR human breast cancer cells, *Biomaterials.* 35 (2014) 9495–9507.
- [73] M. Ghoul, M. Bacquet, M. Morcellet, Uptake of heavy metals from synthetic aqueous solutions using modified PEI-silica gels, *Water Res.* 37 (2003) 729–734.
- [74] W. Huang, M. Lv, Z. Gao, Polyethylenimine grafted with diblock copolymers of polyethylene glycol and polycaprolactone as siRNA delivery vector, *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 152 Suppl 1 (2011) e143–145.
- [75] Y.-F. Chu, C.-H. Hsu, P.K. Soma, Y.M. Lo, Immobilization of bioluminescent *Escherichia coli* cells using natural and artificial fibers treated with polyethylenimine, *Bioresour. Technol.* 100 (2009) 3167–3174.
- [76] I.S. Tan, K.T. Lee, Immobilization of β -glucosidase from *Aspergillus niger* on κ -carrageenan hybrid matrix and its application on the production of reducing sugar from macroalgae cellulosic residue, *Bioresour. Technol.* 184 (2015) 386–394.
- [77] G. Doria, J. Conde, B. Veigas, L. Giestas, C. Almeida, M. Assunção, João Rosa, Pedro V Baptista, Noble Metal Nanoparticles for Biosensing Applications, *Sensors.* 12 (2012) 1657–1687.

- [78] H. Zhu, M. Du, M. Zhang, P. Wang, S. Bao, L. Wang, Fu Y, Yao J., Facile fabrication of AgNPs/(PVA/PEI) nanofibers: high electrochemical efficiency and durability for biosensors, *Biosens. Bioelectron.* 49 (2013) 210–215.
- [79] S.A. Bhakta, E. Evans, T.E. Benavidez, C.D. Garcia, Protein adsorption onto nanomaterials for the development of biosensors and analytical devices: a review, *Anal. Chim. Acta.* 872 (2015) 7–25.
- [80] M. Holzinger, A. Le Goff, S. Cosnier, Nanomaterials for biosensing applications: a review, *Front. Chem.* 2 (2014) 63.
- [81] L. Nie, F. Liu, P. Ma, X. Xiao, Applications of gold nanoparticles in optical biosensors, *J. Biomed. Nanotechnol.* 10 (2014) 2700–2721.
- [82] C. Yang, M.E. Denno, P. Pyakurel, B.J. Venton, Recent trends in carbon nanomaterial-based electrochemical sensors for biomolecules: A review, *Anal. Chim. Acta.* 887 (2015) 17–37.
- [83] J. Turkevich, P.C. Stevenson, J. Hillier, A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold, *Discuss. Faraday Soc.* 11 (1951) 55–75.
- [84] F.F. Tao, Z. Ma, Water-gas shift on gold catalysts: catalyst systems and fundamental studies, *Phys. Chem. Chem. Phys. PCCP.* 15 (2013) 15260–15270.
- [85] L.E. Cole, R.D. Ross, J.M. Tilley, T. Vargo-Gogola, R.K. Roeder, Gold nanoparticles as contrast agents in x-ray imaging and computed tomography, *Nanomed.* 10 (2015) 321–341.
- [86] H. Daraee, A. Eatemadi, E. Abbasi, S. Fekri Aval, M. Kouhi, A. Akbarzadeh, Application of gold nanoparticles in biomedical and drug delivery, *Artif. Cells Nanomedicine Biotechnol.* (2014) 1–13.
- [87] M.S. Khan, G.D. Vishakante, null Siddaramaiah H, Gold nanoparticles: a paradigm shift in biomedical applications, *Adv. Colloid Interface Sci.* 199-200 (2013) 44–58.
- [88] E. Hutter, D. Maysinger, Gold-nanoparticle-based biosensors for detection of enzyme activity, *Trends Pharmacol. Sci.* 34 (2013) 497–507.
- [89] V.K.K. Upadhyayula, Functionalized gold nanoparticle supported sensory mechanisms applied in detection of chemical and biological threat agents: a review, *Anal. Chim. Acta.* 715 (2012) 1–18.
- [90] W. Putzbach, N.J. Ronkainen, Immobilization techniques in the fabrication of nanomaterial-based electrochemical biosensors: a review, *Sensors.* 13 (2013) 4811–4840. d
- [91] S.G. L. Cabrera, Magnetite nanoparticles: Electrochemical synthesis and characterization, *Electrochimica Acta.* 53 (2008) 3436–3441.
- [92] R. Kaur, A. Hasan, N. Iqbal, S. Alam, M.K. Saini, S.K. Raza, Synthesis and surface engineering of magnetic nanoparticles for environmental cleanup and pesticide residue analysis: a review, *J. Sep. Sci.* 37 (2014) 1805–1825.
- [93] R. Ghosh Chaudhuri, S. Paria, Core/shell nanoparticles: classes, properties, synthesis mechanisms, characterization, and applications, *Chem. Rev.* 112 (2012) 2373–2433.
- [94] J. Xu, J. Sun, Y. Wang, J. Sheng, F. Wang, M. Sun, Application of iron magnetic nanoparticles in protein immobilization, *Mol. Basel Switz.* 19 (2014) 11465–11486.
- [95] J. Liu, Z. Zhao, P. Shao, F. Cui, Activation of peroxymonosulfate with magnetic Fe₃O₄–MnO₂ core–shell nanocomposites for 4-chlorophenol degradation, *Chem. Eng. J.* 262 (2015) 854–861.
- [96] L.H. Reddy, J.L. Arias, J. Nicolas, P. Couvreur, Magnetic nanoparticles: design and characterization, toxicity and biocompatibility, pharmaceutical and biomedical applications, *Chem. Rev.* 112 (2012) 5818–5878.
- [97] A. Singh, S. Poshtiban, S. Evoy, Recent Advances in Bacteriophage Based Biosensors for Food-Borne Pathogen Detection, *Sensors.* 13 (2013) 1763–1786.

- [98] M.H. Mashhadizadeh, M. Amoli-Diva, M.R. Shapouri, H. Afruzi, Solid phase extraction of trace amounts of silver, cadmium, copper, mercury, and lead in various food samples based on ethylene glycol bis-mercaptoacetate modified 3-(trimethoxysilyl)-1-propanethiol coated Fe₃O₄ nanoparticles, *Food Chem.* 151 (2014) 300–305.
- [99] C. Garcia-Galan, Á. Berenguer-Murcia, R. Fernandez-Lafuente, R.C. Rodrigues, Potential of Different Enzyme Immobilization Strategies to Improve Enzyme Performance, *Adv. Synth. Catal.* 353 (2011) 2885–2904.
- [100] I. Giouroudi, F. Keplinger, Microfluidic biosensing systems using magnetic nanoparticles, *Int. J. Mol. Sci.* 14 (2013) 18535–18556.
- [101] J.B. Haun, T.-J. Yoon, H. Lee, R. Weissleder, Magnetic nanoparticle biosensors, *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 2 (2010) 291–304.
- [102] A. van Reenen, A.M. de Jong, J.M.J. den Toonder, M.W.J. Prins, Integrated lab-on-chip biosensing systems based on magnetic particle actuation--a comprehensive review, *Lab. Chip.* 14 (2014) 1966–1986.
- [103] S. Kruss, A.J. Hilmer, J. Zhang, N.F. Reuel, B. Mu, M.S. Strano, Carbon nanotubes as optical biomedical sensors, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65 (2013) 1933–1950.
- [104] T. Sarkar, Y. Gao, A. Mulchandani, Carbon nanotubes-based label-free affinity sensors for environmental monitoring, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 170 (2013) 1011–1025.
- [105] A.G. Marroquín-Cardona, N.M. Johnson, T.D. Phillips, A.W. Hayes, Mycotoxins in a changing global environment--a review, *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 69 (2014) 220–230.
- [106] F. Malir, V. Ostry, A. Pfohl-Leszkowicz, J. Toman, I. Bazin, T. Roubal, Transfer of ochratoxin A into tea and coffee beverages, *Toxins.* 6 (2014) 3438–3453.
- [107] A. Pfohl-Leszkowicz, R.A. Manderville, Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans, *Mol. Nutr. Food Res.* 51 (2007) 61–99.
- [108] K.J. van der Merwe, P.S. Steyn, L. Fourie, D.B. Scott, J.J. Theron, Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh, *Nature.* 205 (1965) 1112–1113.
- [109] R.R. Marquardt, A.A. Frohlich, A review of recent advances in understanding ochratoxicosis, *J. Anim. Sci.* 70 (1992) 3968–3988.
- [110] D. Höhler, Ochratoxin A in food and feed: occurrence, legislation and mode of action, *Z. Für Ernährungswissenschaft.* 37 (1998) 2–12.
- [111] R. Mateo, A. Medina, E.M. Mateo, F. Mateo, M. Jiménez, An overview of ochratoxin A in beer and wine, *Int. J. Food Microbiol.* 119 (2007) 79–83.
- [112] A.B. Trivedi, E. Doi, N. Kitabatake, Detoxification of Ochratoxin A on Heating under Acidic and Alkaline Conditions, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 56 (1992) 741–745.
- [113] X. Chang, Z. Wu, S. Wu, Y. Dai, C. Sun, Degradation of ochratoxin A by *Bacillus amyloliquefaciens* ASAG1, *Food Addit. Contam. Part Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* (2014) 1–8.
- [114] M. Castegnaro, D. Canadas, T. Vrabcheva, T. Petkova-Bocharova, I.N. Chernozemsky, A. Pfohl-Leszkowicz, Balkan endemic nephropathy: role of ochratoxins A through biomarkers, *Mol. Nutr. Food Res.* 50 (2006) 519–529.
- [115] M. Peraica, A.-M. Domijan, M. Miletić-Medved, R. Fuchs, The involvement of mycotoxins in the development of endemic nephropathy, *Wien. Klin. Wochenschr.* 120 (2008) 402–407.
- [116] T. Petkova-Bocharova, M. Castegnaro, Ochratoxin A in human blood in relation to Balkan endemic nephropathy and urinary tract tumours in Bulgaria, *IARC Sci. Publ.* (1991) 135–137.

- [117] W. Hassen, S. Abid-Essafi, A. Achour, N. Guezzah, A. Zakhama, F. Ellouz, Creppy EE, Bacha H, Karyomegaly of tubular kidney cells in human chronic interstitial nephropathy in Tunisia: respective role of Ochratoxin A and possible genetic predisposition, *Hum. Exp. Toxicol.* 23 (2004) 339–346.
- [118] G. Schwerdt, R. Freudinger, S. Silbernagl, M. Gekle, Ochratoxin A-binding proteins in rat organs and plasma and in different cell lines of the kidney, *Toxicology*. 135 (1999) 1–10.
- [119] C.A. González-Arias, A.B. Benitez-Trinidad, M. Sordo, L. Robledo-Marengo, I.M. Medina-Díaz, B.S. Barrón-Vivanco, Marín S, Sanchis V, Ramos AJ, Rojas-García AE..., Low doses of ochratoxin A induce micronucleus formation and delay DNA repair in human lymphocytes, *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 74 (2014) 249–254.
- [120] E.E. Creppy, F.C. Størmer, R. Rösenthaller, G. Dirheimer, Effects of two metabolites of ochratoxin A, (4R)-4-hydroxyochratoxin A and ochratoxin alpha, on immune response in mice, *Infect. Immun.* 39 (1983) 1015–1018.
- [121] I.P. Hallén, A. Breitholtz-Emanuelsson, K. Hult, M. Olsen, A. Oskarsson, Placental and lactational transfer of ochratoxin A in rats, *Nat. Toxins*. 6 (1998) 43–49.
- [122] F. Minervini, A. Giannoccaro, M. Nicassio, G. Panzarini, G.M. Lacalandra, First evidence of placental transfer of ochratoxin A in horses, *Toxins*. 5 (2013) 84–92.
- [123] T. Petkova-Bocharova, I.I. Stoichev, I.N. Chernozemsky, M. Castegnaro, A. Pfohl-Leszkowicz, Formation of DNA adducts in tissues of mouse progeny through transplacental contamination and/or lactation after administration of a single dose of ochratoxin A to the pregnant mother, *Environ. Mol. Mutagen.* 32 (1998) 155–162.
- [124] G. Biasucci, G. Calabrese, R. Di Giuseppe, G. Carrara, F. Colombo, B. Mandelli, Maj M, Bertuzzi T, Pietri A, Rossi F., The presence of ochratoxin A in cord serum and in human milk and its correspondence with maternal dietary habits, *Eur. J. Nutr.* 50 (2011) 211–218.
- [125] K. Doi, K. Uetsuka, Mechanisms of mycotoxin-induced neurotoxicity through oxidative stress-associated pathways, *Int. J. Mol. Sci.* 12 (2011) 5213–5237.
- [126] X. Zhang, C. Boesch-Saadatmandi, Y. Lou, S. Wolfram, P. Huebbe, G. Rimbach, Ochratoxin A induces apoptosis in neuronal cells, *Genes Nutr.* 4 (2009) 41–48.
- [127] K. Imaida, M. Hirose, T. Ogiso, Y. Kurata, N. Ito, Quantitative analysis of initiating and promoting activities of five mycotoxins in liver carcinogenesis in rats, *Cancer Lett.* 16 (1982) 137–143.
- [128] H. Mori, K. Kawai, F. Ohbayashi, T. Kuniyasu, M. Yamazaki, T. Hamasaki, Williams GM., Genotoxicity of a variety of mycotoxins in the hepatocyte primary culture/DNA repair test using rat and mouse hepatocytes, *Cancer Res.* 44 (1984) 2918–2923.
- [129] A. Limonciel, P. Jennings, A review of the evidence that ochratoxin A is an Nrf2 inhibitor: implications for nephrotoxicity and renal carcinogenicity, *Toxins*. 6 (2014) 371–379.
- [130] S.C. Duarte, A. Pena, C.M. Lino, A review on ochratoxin A occurrence and effects of processing of cereal and cereal derived food products, *Food Microbiol.* 27 (2010) 187–198.
- [131] J. Gil-Serna, B. Patiño, L. Cortes, M.T. Gonzalez-Jaen, C. Vazquez, *Aspergillus steynii* and *Aspergillus westerdijkiae* as potential risk of OTA contamination in food products in warm climates, *Food Microbiol.* 46 (2015) 168–175.
- [132] S.A. Tittlemier, E. Varga, P.M. Scott, R. Krska, Sampling of cereals and cereal-based foods for the determination of ochratoxin A: an overview, *Food Addit. Contam. Part Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* 28 (2011) 775–785.

- [133] S.A. Chiraz Zaied, Natural occurrence of ochratoxin A in Tunisian cereals, *Food Control*. 20 (2009) 218–222.
- [134] M.B. Coronel, S. Marín, G. Cano-Sancho, A.J. Ramos, V. Sanchis, Exposure assessment to ochratoxin A in Catalonia (Spain) based on the consumption of cereals, nuts, coffee, wine, and beer, *Food Addit. Contam. Part Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* 29 (2012) 979–993.
- [135] W.S. Darwish, Y. Ikenaka, S.M.M. Nakayama, M. Ishizuka, An overview on mycotoxin contamination of foods in Africa, *J. Vet. Med. Sci. Jpn. Soc. Vet. Sci.* 76 (2014) 789–797.
- [136] G. Battaccone, A. Nudda, G. Pulina, Effects of ochratoxin a on livestock production, *Toxins*. 2 (2010) 1796–1824.
- [137] J. Rubert, N. León, C. Sáez, C.P.B. Martins, M. Godula, V. Yusà, Mañes J, Soriano JM, Soler C, Evaluation of mycotoxins and their metabolites in human breast milk using liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta*. 820 (2014) 39–46.
- [138] L. Reddy, K. Bhoola, Ochratoxins-food contaminants: impact on human health, *Toxins*. 2 (2010) 771–779.
- [139] M.A. Baffi, S. Romo-Sánchez, J. Ubeda-Iranzo, A.I. Briones-Pérez, Fungi isolated from olive ecosystems and screening of their potential biotechnological use, *New Biotechnol.* 29 (2012) 451–456.
- [140] R. Ferracane, A. Tafuri, A. Logieco, F. Galvano, D. Balzano, A. Ritieni, Simultaneous determination of aflatoxin B1 and ochratoxin A and their natural occurrence in Mediterranean virgin olive oil, *Food Addit. Contam.* 24 (2007) 173–180.
- [141] S. Roussos, N. Zaouia, G. Salih, A. Tantaoui-Elaraki, K. Lamrani, M. Cheheb, Ismaili-Alaoui M, Characterization of filamentous fungi isolated from Moroccan olive and olive cake: toxinogenic potential of *Aspergillus* strains, *Mol. Nutr. Food Res.* 50 (2006) 500–506.
- [142] A. Papachristou, P. Markaki, Determination of ochratoxin A in virgin olive oils of Greek origin by immunoaffinity column clean-up and high-performance liquid chromatography, *Food Addit. Contam.* 21 (2004) 85–92.
- [143] Risk assessment and risk management of mycotoxins, *IARC Sci. Publ.* (2012) 105–117.
- [144] G.S. Shephard, Impact of mycotoxins on human health in developing countries, *Food Addit. Contam. Part Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* 25 (2008) 146–151.
- [145] M. Denli, J.F. Perez, Ochratoxins in feed, a risk for animal and human health: control strategies, *Toxins*. 2 (2010) 1065–1077.
- [146] N. Magan, D. Aldred, Conditions of formation of ochratoxin A in drying, transport and in different commodities, *Food Addit. Contam.* 22 Suppl 1 (2005) 10–16.
- [147] L. Abrunhosa, R.R.M. Paterson, A. Venâncio, Biodegradation of ochratoxin a for food and feed decontamination, *Toxins*. 2 (2010) 1078–1099.
- [148] A. Bruinink, T. Rasonyi, C. Sidler, Differences in neurotoxic effects of ochratoxin A, ochracin and ochratoxin-alpha in vitro, *Nat. Toxins*. 6 (1998) 173–177.
- [149] A. Petchkongkaew, P. Taillandier, P. Gasaluck, A. Lebrihi, Isolation of *Bacillus* spp. from Thai fermented soybean (Thua-nao): screening for aflatoxin B1 and ochratoxin A detoxification, *J. Appl. Microbiol.* 104 (2008) 1495–1502.
- [150] S. Fuchs, G. Sontag, R. Stidl, V. Ehrlich, M. Kundi, S. Knasmüller, Detoxification of patulin and ochratoxin A, two abundant mycotoxins, by lactic acid bacteria, *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 46 (2008) 1398–1407.
- [151] G. Schatzmayr, D. Heidler, E. Fuchs, E.M. Binder, A.P. Loibner, R. Braun, Evidence of ochratoxin A-detoxification activity of rumen fluid, intestinal fluid and soil samples

- as well as isolation of relevant microorganisms from these environments, *Mycotoxin Res.* 18 Suppl 2 (2002) 183–187.
- [152] M. Mobashar, J. Hummel, R. Blank, K.-H. Südekum, Ochratoxin A in ruminants—A review on its degradation by gut microbes and effects on animals, *Toxins*. 2 (2010) 809–839.
- [153] H. Bejaoui, F. Mathieu, P. Taillandier, A. Lebrihi, Biodegradation of ochratoxin A by *Aspergillus* section *Nigri* species isolated from French grapes: a potential means of ochratoxin A decontamination in grape juices and musts, *FEMS Microbiol. Lett.* 255 (2006) 203–208.
- [154] G. Engelhardt, Degradation of ochratoxin a and b by the white rot fungus *pleurotus ostreatus*, *Mycotoxin Res.* 18 (2002) 37–43.
- [155] J. Varga, Z. Péteri, K. Tábori, J. Téren, C. Vágvolgyi, Degradation of ochratoxin A and other mycotoxins by *Rhizopus* isolates, *Int. J. Food Microbiol.* 99 (2005) 321–328.
- [156] Z. Péteri, J. Téren, C. Vágvolgyi, J. Varga, Ochratoxin degradation and adsorption caused by astaxanthin-producing yeasts, *Food Microbiol.* 24 (2007) 205–210.
- [157] A. Angioni, P. Caboni, A. Garau, A. Farris, D. Orro, M. Budroni, Cabras P., In vitro interaction between ochratoxin A and different strains of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata*, *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 2043–2048.
- [158] M.J. Pitout, The hydrolysis of ochratoxin A by some proteolytic enzymes, *Biochem. Pharmacol.* 18 (1969) 485–491.
- [159] M.A. Stander, P.S. Steyn, F.H. van Der Westhuizen, B.E. Payne, A kinetic study into the hydrolysis of the ochratoxins and analogues by carboxypeptidase A, *Chem. Res. Toxicol.* 14 (2001) 302–304.
- [160] L. Abrunhosa, L. Santos, A. Venâncio, Degradation of Ochratoxin A by Proteases and by a Crude Enzyme of *Aspergillus niger*, *Food Biotechnol.* 20 (2006) 231–242.
- [161] M.A. Stander, U.T. Bornscheuer, E. Henke, P.S. Steyn, Screening of commercial hydrolases for the degradation of ochratoxin A, *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000) 5736–5739.
- [162] D. Dobritsch, H. Wang, G. Schneider, S. Yu, Structural and functional characterization of ochratoxinase, a novel mycotoxin-degrading enzyme, *Biochem. J.* 462 (2014) 441–452.
- [163] J.O.F. V. L. Pereira, Mycotoxins in cereals and related foodstuffs: A review on occurrence and recent methods of analysis, *Trends Food Sci. Amp Technol.* 36 (2014).
- [164] N. Al-Hadithi, P. Kössler, P. Karlovsky, Determination of Ochratoxin A in Wheat and Maize by Solid Bar Microextraction with Liquid Chromatography and Fluorescence Detection, *Toxins*. 7 (2015) 3000–3011.
- [165] K.T.N. Nguyen, D. Ryu, Ultrasonic extraction with ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry for the determination of ochratoxin a in processed cereal products, *J. AOAC Int.* 97 (2014) 1384–1386.
- [166] S. Noba, A. Uyama, N. Mochizuki, Determination of ochratoxin a in ready-to-drink coffee by immunoaffinity cleanup and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 6036–6040.
- [167] Y. Rodríguez-Carrasco, G. Font, J.C. Moltó, H. Berrada, Quantitative determination of trichothecenes in breadsticks by gas chromatography-triple quadrupole tandem mass spectrometry, *Food Addit. Contam. Part Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* 31 (2014) 1422–1430.
- [168] J. Olsson, T. Börjesson, T. Lundstedt, J. Schnürer, Detection and quantification of ochratoxin A and deoxynivalenol in barley grains by GC-MS and electronic nose, *Int. J. Food Microbiol.* 72 (2002) 203–214.

- [169] E.P. Meulenbergh, Immunochemical methods for ochratoxin A detection: a review, *Toxins*. 4 (2012) 244–266.
- [170] J.J. Pestka, B.W. Steinert, F.S. Chu, Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of ochratoxin A, *Appl. Environ. Microbiol.* 41 (1981) 1472–1474.
- [171] X.-H. Wang, T. Liu, N. Xu, Y. Zhang, S. Wang, Enzyme-linked immunosorbent assay and colloidal gold immunoassay for ochratoxin A: investigation of analytical conditions and sample matrix on assay performance, *Anal. Bioanal. Chem.* 389 (2007) 903–911.
- [172] N.W. Turner, S. Subrahmanyam, S.A. Piletsky, Analytical methods for determination of mycotoxins: a review, *Anal. Chim. Acta.* 632 (2009) 168–180.
- [173] M.S. Klarić, Z. Cvetnić, S. Pepelnjak, I. Kosalec, Co-occurrence of aflatoxins, ochratoxin A, fumonisins, and zearalenone in cereals and feed, determined by competitive direct enzyme-linked immunosorbent assay and thin-layer chromatography, *Arh. Hig. Rada Toksikol.* 60 (2009) 427–434.
- [174] M.B. Moressi, A. Zon, H. Fernandez, G. Rivas, V. Solis, Amperometric quantification of *Alternaria* mycotoxins with a mushroom tyrosinase modified carbon paste electrode, *Electrochem. Commun.* 1 (1999) 472–476.
- [175] M.A. Alonso-Lomillo, O. Domínguez-Renedo, L.D.T. Román, M.J. Arcos-Martínez, Horseradish peroxidase-screen printed biosensors for determination of Ochratoxin A, *Anal. Chim. Acta.* 688 (2011) 49–53.
- [176] M.A. Alonso-Lomillo, O. Domínguez-Renedo, L. Ferreira-Gonçalves, M.J. Arcos-Martínez, Sensitive enzyme-biosensor based on screen-printed electrodes for Ochratoxin A, *Biosens. Bioelectron.* 25 (2010) 1333–1337.
- [177] V.G. Eijssink, O.R. Veltman, W. Aukema, G. Vriend, G. Venema, Structural determinants of the stability of thermolysin-like proteinases, *Nat. Struct. Biol.* 2 (1995) 374–379.
- [178] U. Eichhorn, A.S. Bommarius, K. Drauz, H.D. Jakubke, Synthesis of dipeptides by suspension-to-suspension conversion via thermolysin catalysis: from analytical to preparative scale, *J. Pept. Sci. Off. Publ. Eur. Pept. Soc.* 3 (1997) 245–251.
- [179] M.B. Rao, A.M. Tanksale, M.S. Ghatge, V.V. Deshpande, Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases, *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR.* 62 (1998) 597–635.
- [180] H.M. Holden, B.W. Matthews, The binding of L-valyl-L-tryptophan to crystalline thermolysin illustrates the mode of interaction of a product of peptide hydrolysis, *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 3256–3260.
- [181] F.W. Dahlquist, J.W. Long, W.L. Bigbee, Role of Calcium in the thermal stability of thermolysin, *Biochemistry (Mosc.)*. 15 (1976) 1103–1111.
- [182] M. Tajima, I. Urabe, K. Yutani, H. Okada, Role of calcium ions in the thermostability of thermolysin and *Bacillus subtilis* var. *amylosacchariticus* neutral protease, *Eur. J. Biochem. FEBS.* 64 (1976) 243–247.
- [183] V. Pelmeshnikov, M.R.A. Blomberg, P.E.M. Siegbahn, A theoretical study of the mechanism for peptide hydrolysis by thermolysin, *J. Biol. Inorg. Chem. JBIC Publ. Soc. Biol. Inorg. Chem.* 7 (2002) 284–298.
- [184] K. Morihara, H. Tsuzuki, Thermolysin: kinetic study with oligopeptides, *Eur. J. Biochem. FEBS.* 15 (1970) 374–380.
- [185] H. Matsubara, Observations on the specificity of thermolysin with synthetic peptides, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 24 (1966) 427–430.
- [186] R. Hayashi, S. Aibara, T. Hata, A unique carboxypeptidase activity of yeast proteinase C, *Biochim. Biophys. Acta.* 212 (1970) 359–361.

- [187] D.H. Wolf, G.R. Fink, Proteinase C (carboxypeptidase Y) mutant of yeast, *J. Bacteriol.* 123 (1975) 1150–1156.
- [188] B.A. Hemmings, G.S. Zubenko, A. Hasilik, E.W. Jones, Mutant defective in processing of an enzyme located in the lysosome-like vacuole of *Saccharomyces cerevisiae*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78 (1981) 435–439.
- [189] J.A. Endrizzi, K. Breddam, S.J. Remington, 2.8-Å structure of yeast serine carboxypeptidase, *Biochemistry (Mosc.)*. 33 (1994) 11106–11120.
- [190] R.B. Trimble, F. Maley, Subunit structure of external invertase from *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.* 252 (1977) 4409–4412.
- [191] C. Hashimoto, R.E. Cohen, W.J. Zhang, C.E. Ballou, Carbohydrate chains on yeast carboxypeptidase Y are phosphorylated, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78 (1981) 2244–2248.
- [192] A. Hamberg, M. Kempka, J. Sjö Dahl, J. Roeraade, K. Hult, C-terminal ladder sequencing of peptides using an alternative nucleophile in carboxypeptidase Y digests, *Anal. Biochem.* 357 (2006) 167–172.
- [193] G. Jung, H. Ueno, R. Hayashi, Carboxypeptidase Y: structural basis for protein sorting and catalytic triad, *J. Biochem. (Tokyo)*. 126 (1999) 1–6.
- [194] Y. Bai, R. Hayashi, Properties of the single sulfhydryl group of carboxypeptidase Y. Effects of alkyl and aromatic mercurials on activities toward various synthetic substrates, *J. Biol. Chem.* 254 (1979) 8473–8479.
- [195] W.S. Lewis, S.M. Schuster, Carboxypeptidase Y stability, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 20818–20822.
- [196] H.R. Stennicke, U.H. Mortensen, K. Breddam, Studies on the hydrolytic properties of (serine) carboxypeptidase Y, *Biochemistry (Mosc.)*. 35 (1996) 7131–7141.
- [197] R. Hayashi, Y. Bai, T. Hata, Kinetic Studies of Carboxypeptidase Y I. Kinetic Parameters for the Hydrolysis of Synthetic Substrates, *J. Biochem. (Tokyo)*. 77 (1975) 69–79.

MATERIELS ET METHODES

CHAPITRE II

Matériels et méthodes

II.1. Réactifs et préparation des solutions

II.1.1. Réactifs

L'ochratoxine A (OTA, produite par *Petromyces albertensis*, $\geq 98\%$), la thermolysine (TLN, isolée de *Bacillus thermoproteolyticus* Rokko, 50 - 100 unités / mg de protéine), la carboxypeptidase Y (CPY, isolée de *Saccharomyces cerevisiae*, 50-100 unités / mg de protéine), l'albumine de sérum bovin (BSA, $\geq 96\%$), le polyéthylèneimine (PEI ramifié, $M_w = 750\,000$, solution aqueuse à 50%), l'alcool polyvinylique (PVA hydrolysé à 88%, $M_w = 88\,000$), le glutaraldéhyde (GA, grade II, solution aqueuse à 25%), NaH_2PO_4 ($> 99\%$), Na_2HPO_4 (98%), l'éthanol ($> 99,8\%$), l'hexane ($> 99,8\%$), le méthanol ($> 99,8\%$) et le dichlorométhane ($> 99,8\%$) ont été fournis par Sigma-Aldrich (France). Le glycérol ($> 99\%$) provenait de Acros Organics (France) et le chlorure de sodium (NaCl , $\geq 99,5\%$) provenait de Fluka (France). Un kit commercial d'ELISA (Ota READ fast) produit par LCtech, GmbH, l'Allemagne a également été utilisé.

II.1.2. Préparation des solutions

Toutes les solutions aqueuses ont été préparées avec de l'eau ultra-pure (résistivité $> 18\text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$) obtenue à partir d'un système de purification MilliQ.

Préparation du mélange de PVA/PEI

Deux solutions concentrées de PVA et de PEI (12 % en masse) ont été, tout d'abord, préparées. La première a été obtenue par dissolution de poudre de PVA dans de l'eau à $80\text{ }^\circ\text{C}$ pendant 3 h sous agitation magnétique, puis refroidissement à température ambiante. La

solution de PEI a été obtenue par simple dilution de la solution commerciale à 50% dans de l'eau ultra-pure. Des volumes adéquats des deux solutions ont ensuite été mélangés sous agitation magnétique pendant une nuit pour obtenir une solution homogène de PVA/PEI 3 :1 (m / m) [1]. La solution a été finalement diluée par 100 pour réduire la viscosité et faciliter les manipulations ultérieures.

Préparation des tampons phosphate

Les tampons phosphates utilisés dans ce travail ont été obtenus par mélange de volumes adéquats de solutions de NaH_2PO_4 et Na_2HPO_4 , de manière à obtenir le pH souhaité. Le tampon phosphate salin (PBS) a été préparé par la dissolution des pastilles dans de l'eau ultra pure sous agitation.

II.2. Synthèse des nanoparticules d'or

Les nanoparticules d'or (AuNPs), stabilisées par des ions citrates, ont été fournies par le Laboratoire Hubert Curien (Saint-Etienne). Elles ont été synthétisées à température ambiante selon la méthode de Turkevich [2]. Cette méthode est basée sur la réduction d'un sel d'or au degré d'oxydation III (HAuCl_4) par le citrate de sodium en phase aqueuse (Fig II.1). Le citrate et le produit de son oxydation (le dicarboxylate d'acétone) agissent comme des agents protecteurs aussi bien que stabilisateurs des nanoparticules durant la synthèse. Les ions citrate en solution s'adsorbent à la surface des particules pour créer une couche chargée négativement, ceci introduit une répulsion électrostatique entre ces particules empêchant leur agrégation et permettant ainsi leur stabilisation. Cette voie de synthèse, comparées à d'autres, conduit à la production de particules plus grosses (généralement 8 à 30 nm) [3]. Cette taille peut être contrôlée par un ajustement des conditions de synthèse.

Dans une fiole de 100 mL, $2.9 \cdot 10^{-5}$ mole d'acide tétrachloroaurique trihydraté (III) est dissoute dans 21 mL d'eau pure portée à ébullition sous agitation, puis $9,3 \cdot 10^{-5}$ mole de citrate de sodium, dissoute au préalable dans 7 ml d'eau pure, est ajoutée, toujours sous reflux et agitation continue. La verrerie et l'agitateur sont soigneusement lavés à l'eau régale, l'acétone et l'eau bi-distillée avant utilisation. Un changement de couleur du jaune au rouge-rubis est observé, indiquant la formation des clusters d'or. La réaction est poursuivie sous reflux et agitation douce pendant 30 min puis la suspension est ramenée à température ambiante pour donner une solution de concentration finale de $1.7 \cdot 10^{12}$ NPs/mL.

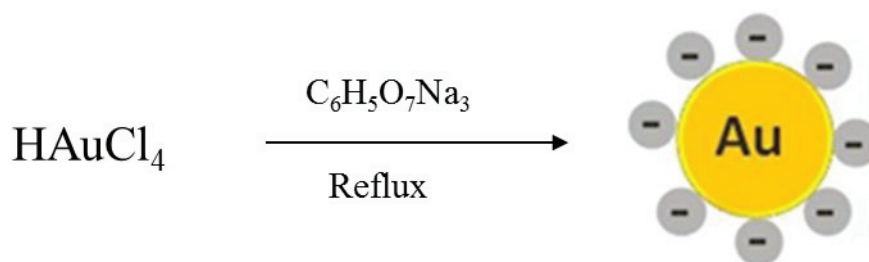


Figure II.1. Principe de la synthèse des nanoparticules d'or par la méthode de Turkevich.

II.3. Transducteurs

II.3.1. Electrodes d'or interdigitées

II.3.1.1. Description

Ce type de transducteur a été utilisé pour effectuer les mesures conductimétriques. Il est constitué de deux paires d'électrodes interdigitées en or placées sur une seule puce pour effectuer les mesures en mode différentiel (Fig II.2). Les électrodes sont fabriquées à l'Institut de Physique des Semi-conducteurs Lashkaryov (IPSL, Kiev, Ukraine) par dépôt sous vide sur substrat céramique (5×30 mm). Une couche intermédiaire de chrome de 50 nm d'épaisseur a été utilisée pour améliorer l'adhésion de la couche d'or. La largeur de chaque doigt ainsi que l'espace interdigital sont de $20 \mu\text{m}$ et la longueur des doigts est d'environ 1 mm. Chaque paire d'électrodes compte 40 doigts et sa surface sensible est d'environ 1 mm^2 .

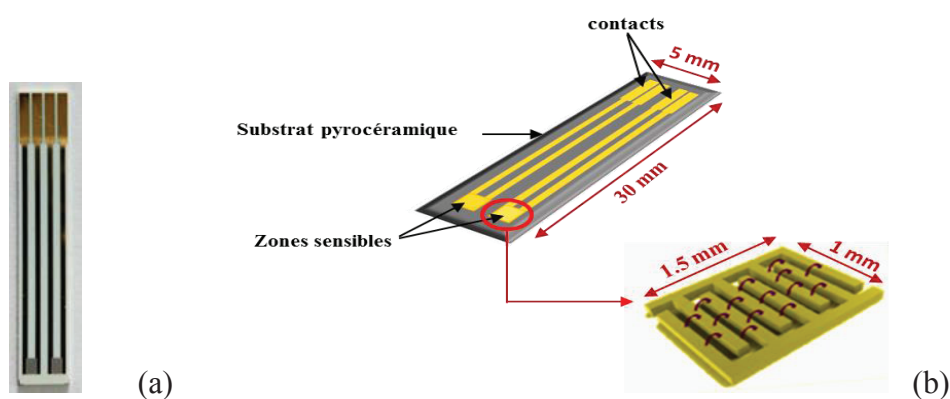


Figure II.2. Microélectrodes d'or interdigitées : photographie (a), représentation schématique (b).

II.3.1.2. Nettoyage et test des transducteurs nus

Une vérification de l'état des pistes en or est tout d'abord réalisée par observation au microscope optique. Les électrodes ayant un aspect dégradé ne seront utilisées que pour des expériences purement qualitatives. Les autres sont ensuite testées pour évaluer de manière quantitative la qualité de l'électrode. Celles présentant les meilleures réponses au test préliminaire en milieu salin seront sélectionnées pour la suite du travail. Un nettoyage des électrodes précède chaque utilisation et consiste en un simple lavage à l'éthanol.

Le test préliminaire effectué sur les électrodes consiste à mesurer la conductivité d'une solution de chlorure de sodium avec deux modes de fonctionnement : le mode A qui permet de mesurer la réponse de chaque électrode séparément et le mode A-B, dit mode différentiel, qui permet d'apprécier la différence de réponse entre les deux électrodes. Les électrodes les plus performantes devront montrer la réponse la plus importante dans le mode A et la plus faible valeur en mode différentiel.

II.3.1.3. Immobilisation des enzymes

Dans un premier temps, les lignes d'or conductrices des électrodes sont recouvertes manuellement avec du vernis acrylique BlocJelt (ITW Spraytec, Asnières sur Seine, France) pour éviter les courants parasites au cours des mesures.

Après cela, deux solutions par biocapteur sont préparées. Un volume de 0,4 μL d'une première solution contenant l'enzyme est déposé sur la paire d'électrodes de travail, tandis que 0,4 μL d'une deuxième solution ayant la même composition que la première, sauf que l'enzyme est remplacée par la BSA, sont déposés sur les électrodes de référence. Le biocapteur est laissé sécher pendant 10 min à température ambiante puis il est placé dans une atmosphère saturée en vapeurs de glutaraldéhyde pendant 35 min. Les membranes sont ensuite séchées à température ambiante pendant 1 h. Après préparation, les biocapteurs sont gardés à sec à 4°C puis reconditionnés dans du tampon phosphate 5 mM pendant au moins 30 min avant la première mesure. Ils sont par ailleurs conservés à 4°C dans du tampon phosphate 20 mM pH 7 entre deux mesures réalisées des jours différents.

La composition des différentes solutions enzymatiques déposées sur les électrodes de travail au cours de cette étude est la suivante :

- ❖ **Biocapteur TLN/BSA** : une solution de tampon phosphate 20 mM pH 7 contenant 5% (m/v) de TLN, 5% (m/v) de BSA et 10% (m/v) de glycérol (Fig II.3.a).
- ❖ **Biocapteur CPY/BSA** : une solution de tampon phosphate 20 mM pH 7 contenant 5% (m/v) de CPY, 5% (m/v) de BSA et 10% (m/v) de glycérol (Fig II.3.a).
- ❖ **Biocapteur TLN/(PVA/PEI)** : une solution de tampon phosphate 20 mM pH 7 contenant 5% (m/v) de TLN et 50% (m/v) de la solution de (PVA/PEI) (Fig II.3.b).

- ❖ **Biocapteur TLN/BSA/AuNPs** : une solution de tampon phosphate 20 mM pH 7 contenant 5% (m/v) de TLN, 5% (m/v) de BSA, 20% (m/v) de la solution d'AuNPs (Fig II.3.c).
- ❖ **Biocapteur TLN/(PVA/PEI)/AuNPs** : une solution de tampon phosphate 20 mM pH 7 contenant 5% (m/v) de TLN, 50 % (m/v) de la solution de (PVA/PEI) et 20% (m/v) de la solution d'AuNPs (Fig II.3.d).

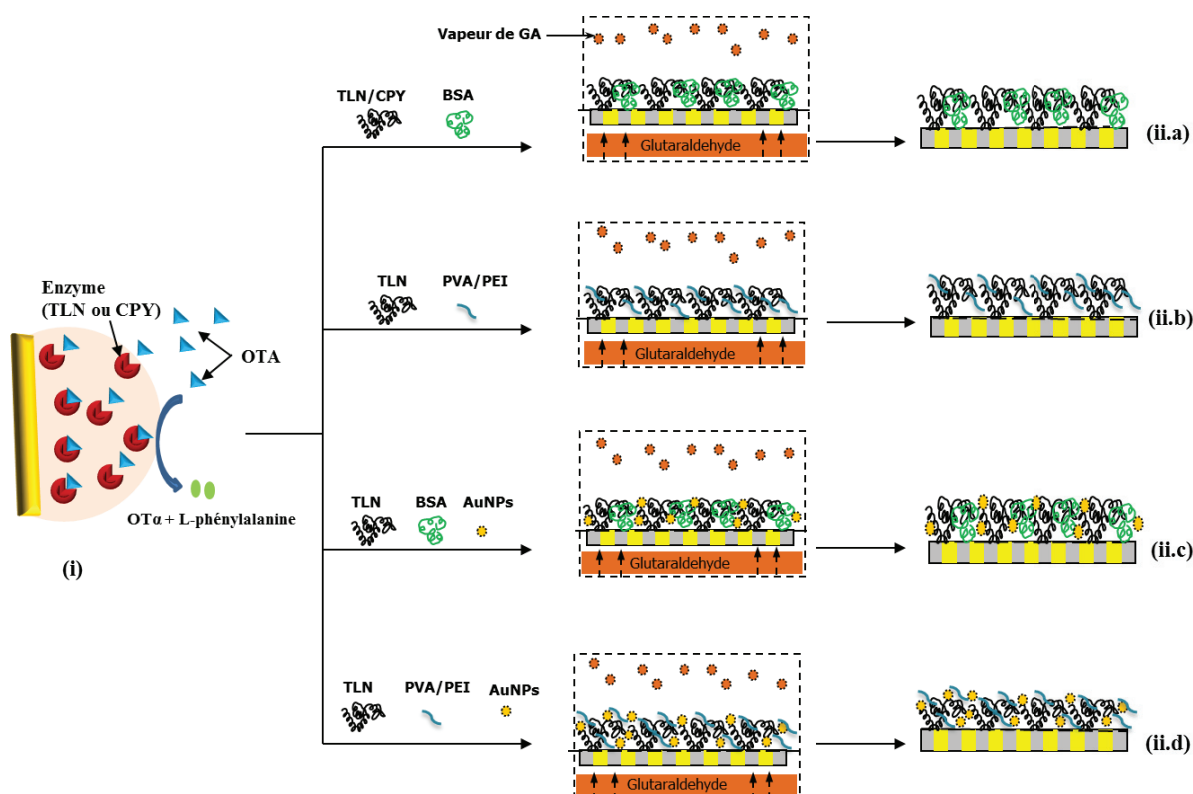


Figure II.3. Représentation schématique du principe (i) et de l'architecture des différents biocapteurs : TLN/BSA ou CPY/BSA (ii.a), TLN/(PVA/PEI) (ii.b), TLN/BSA/AuNPs (ii.c) et TLN/(PVA/PEI)/AuNPs (ii.d).

II.3.2. Electrodes d'or carrées

II.3.2.1. Description

Pour les différentes mesures impédimétriques et voltampérométriques, on utilise des microélectrodes d'or carrées d'une surface totale de 1 cm^2 (Fig II.4). Ces microélectrodes ont été élaborées par le laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes (LAAS, Toulouse) par évaporation sous vide d'une couche d'or, de 300 nm d'épaisseur, sur des substrats de Si/SiO₂ de 800 nm, en utilisant une couche d'adhésion de 30 nm de titane.

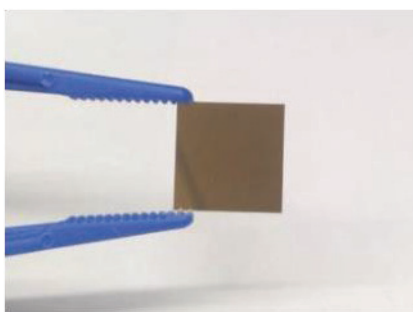


Figure II.4. Microélectrode d'or carrée.

II.3.2.2. Nettoyage et test des transducteurs nus

Le nettoyage a pour but d'enlever la couche de résine sur la surface d'or. Pour ce faire, l'électrode est immergée dans de l'acétone dans un bain à ultrasons pendant 15 min et ensuite séchée sous un flux d'azote. Puis, elle est plongée 5 min dans une solution de piranha contenant un mélange d'acide sulfurique à 98% et de l'eau oxygénée à 35 % (H₂SO₄/H₂O₂ 70 :30 v/v). L'électrode est ensuite rincée abondamment avec de l'eau ultra-pure.

Pour le test, l'électrode d'or ainsi que la contre-électrode de platine et l'électrode de référence sont montées sur la cellule. Celle-ci est remplie d'une solution de tampon phosphate en présence du couple redox [Fe(CN)₆]^{3-/4-}. La cellule est reliée au potentiostat, en imposant une série de balayages en potentiels de -700 mV à 700 mV. Les électrodes les plus performantes devront montrer un voltammogramme présentant deux pics d'oxydoréduction visibles avec une différence de potentiel séparant les deux pics ($\Delta E_p = E_p(\text{ox}) - E_p(\text{red})$) la plus faible possible.

II.3.2.3. Immobilisation des enzymes

Sur ce type de transducteur, 20 μL de la solution décrite précédemment pour la modification des électrodes interdigitées par le mélange TLN/(PVA/PEI)/AuNPs, ont été déposés par spin-coating sur la surface de l'électrode d'or (18 s à 500 tr/min puis 15 s à 1000 tr/min). Les électrodes modifiées ont été séchées à l'air libre pendant 10 min puis exposées

aux vapeurs saturées en glutaraldéhyde pendant 35 min. Dans une deuxième étape, les électrodes modifiées ont été séchées à température ambiante pendant 1 h, puis maintenues pendant une nuit à 4°C.

II.4. Méthodes de caractérisation microscopiques

II.4.1. Microscopie électronique en transmission (TEM)

La microscopie électronique en transmission (TEM) a été utilisée pour déterminer la taille des nanoparticules d'or synthétisées (Fig II.5). Cette technique utilise un faisceau d'électrons à haute tension, émis par un canon à électrons. Des lentilles électromagnétiques sont utilisées pour focaliser le faisceau d'électrons sur l'échantillon. En traversant l'échantillon et les atomes qui le constituent, le faisceau d'électrons produit différentes sortes de rayonnements. En général, seuls les électrons transmis sont analysés par le détecteur traduisant le signal en une image contrastée. Les échantillons doivent être préparés selon un protocole précis, qui doit conserver à la fois leur structure et être conducteur pour laisser passer le faisceau d'électrons. Des coupes très fines de l'échantillon sont réalisées à l'ultramicrotome (de 60 à 100 nanomètres). Des colorations aux métaux lourds sont également possibles pour augmenter le contraste de structures particulières des échantillons.

Dans notre cas, les images TEM ont été obtenues à une tension d'accélération de 120kV (Philips CM 120, Centre Technologique des Microstructures - Lyon 1, Villeurbanne, France). Les solutions diluées de nanoparticules d'or ont été examinées après leur déposition et évaporation à sec sur une grille de cuivre recouverte d'une membrane de Formvar et de carbone.



Figure II.5. Microscopie électronique en transmission.

II.4.2. Microscopie à force atomique (AFM)

La Microscopie à Force Atomique (AFM) est une technique permettant de visualiser avec une résolution nanométrique la morphologie tridimensionnelle de la surface d'un matériau, et de cartographier certaines de ses propriétés (adhésives, mécaniques, magnétiques, électriques...). Le principe de l'AFM est basé sur l'interaction entre la surface de l'échantillon à analyser et une pointe sonde nanométrique, fixée sous un micro-levier. La pointe balaye la surface et suit la topographie de l'échantillon, donnant une image tridimensionnelle du matériau analysé (Fig II.6). L'aire maximale accessible est de 170×170 microns² et la résolution ultime est de l'ordre du dixième de nanomètre. Cette technique permet l'observation des surfaces à l'air et en milieu liquide.

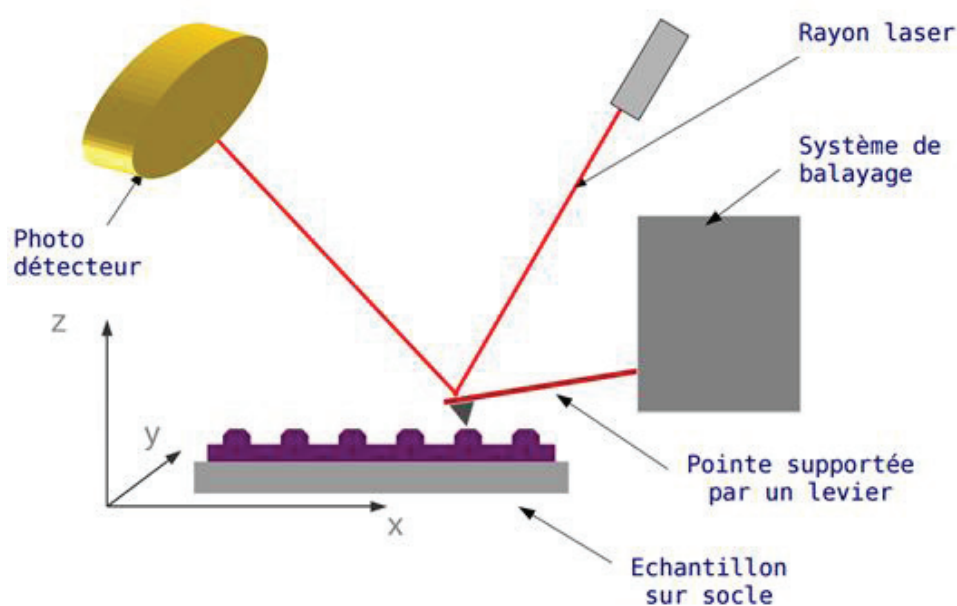


Figure II.6. Schéma du principe d'un microscope à force atomique.

Dans ce travail, les mesures d'AFM ont été réalisées à l'air à température ambiante (la surface analysée est de l'ordre de $5 \mu\text{m}^2$) en utilisant un appareil Nano Observer de la compagnie CSI (France). La pointe utilisée est à base de nitrure de silicium (BIO 77 de Si_3N_4), fournie du (LOT Oriel groupe Europa, Allemagne). Elle fait $100 \mu\text{m}$ de longueur, $18 \mu\text{m}$ de largeur et $0,6 \mu\text{m}$ d'épaisseur, avec une fréquence caractéristique de $95,87 \text{ kHz}$. Les mesures ont été effectuées en mode contact avec une vitesse de scan de $1,25$ ligne par seconde et une résolution de 1024 lignes. La surface caractérisée de l'échantillon est de $5 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$. Les images sont traitées par la suite par le logiciel « Gwyddion ».

II.5. Mesures électrochimiques

II.5.1. Conductimétrie

Les mesures conductimétriques ont été effectuées dans un bécher rempli de 5 mL d'un tampon phosphate 5 mM pH 7 sous agitation magnétique (Fig II.7). Une tension alternative de 10 mV d'amplitude et 100 kHz de fréquence générée par un générateur d'onde à basse fréquence (amplificateur SR830 Lock-in de Stanford Research Systems) a été appliquée aux paires différentielles d'électrodes et la différence de conductance ΔG est mesurée entre la paire d'électrodes de référence et celle de travail (Fig II.8). Les valeurs d'amplitude et de fréquence choisies permettent de limiter les processus faradiques, la charge de la double couche et la polarisation des microélectrodes et d'obtenir la proportionnalité entre le potentiel de sortie et la variation de la conductance.



Figure II.7. Dispositif expérimental pour la mesure conductimétrique.

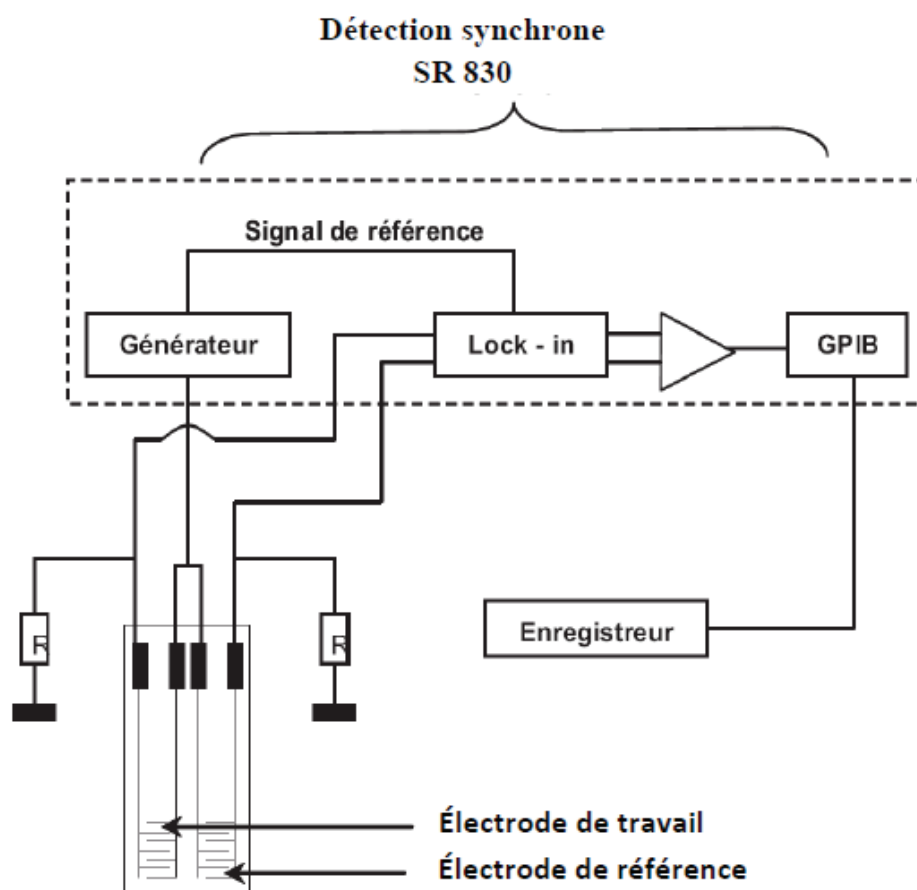


Figure II.8. Montage utilisé pour la mesure conductimétrique.

Après stabilisation du signal de sortie différentiel, de petits volumes (5-75 μL) de solutions concentrées d'OTA préparées dans 5 mM de tampon phosphate et d'éthanol (1: 1) (v: v) sont ajoutées pour parvenir à des concentrations finales bien définies dans la plage de 0,5 à 150 μM ou bien de 2 à 200 nM. Les solutions concentrées d'OTA sont utilisées dans les deux semaines et stockées dans l'obscurité et au frais. Trois mesures répétées sont effectuées pour chaque concentration. La réponse du biocapteur, correspondant à l'évolution de ΔG après addition de l'OTA, est enregistrée. La réponse à l'équilibre ΔG_{ss} résulte de l'équilibre entre la production d'ions par la réaction enzymatique et le flux de diffusion des produits de la réaction enzymatique loin de la surface du transducteur, dans la couche limite (Fig II.9). Les vitesses initiales (V_i) des réactions sont calculées à partir de la partie linéaire initiale de la réponse conductimétrique. Le bruit de fond (N) est mesuré à partir de la partie stable de la courbe juste avant l'injection. La limite de détection est calculée comme étant la concentration d'OTA conduisant à trois fois le rapport signal sur bruit ($\Delta G_{ss}/N=3$).

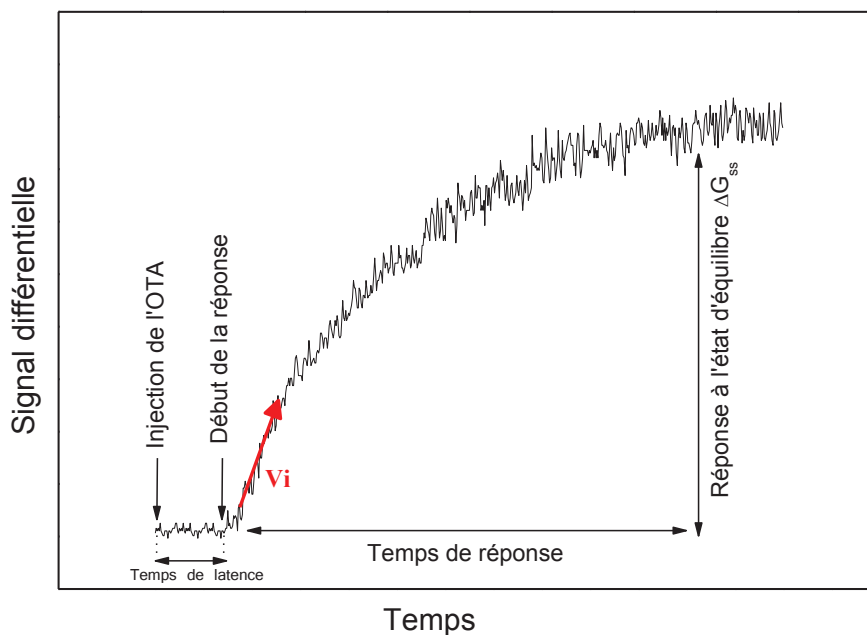


Figure II.9. Modèle de la réponse conductimétrique.

II.5.2. Impédancemétrie et la voltampérométrie cyclique

Pour effectuer les mesures par spectroscopie d'impédance et voltampérométrie cyclique, le même dispositif expérimental a été utilisé. Il s'agit d'une cellule électrochimique en verre (Verre Equipements, Collonges au Mont d'Or, France) à trois électrodes de volume 5 mL. En premier lieu, la cellule est lavée avec une solution d'acide sulfo-chromique puis avec de l'eau ultra-pure et enfin séchée dans l'étuve avant et après toute utilisation. Trois électrodes sont installées dans cette cellule (Fig II.10) :

- l'électrode de travail en or avec une surface active de $0,152\text{cm}^2$,
- une contre électrode en platine d'une surface active plus grande ($0,282\text{ cm}^2$),
- une électrode de référence au calomel saturée (SCE).

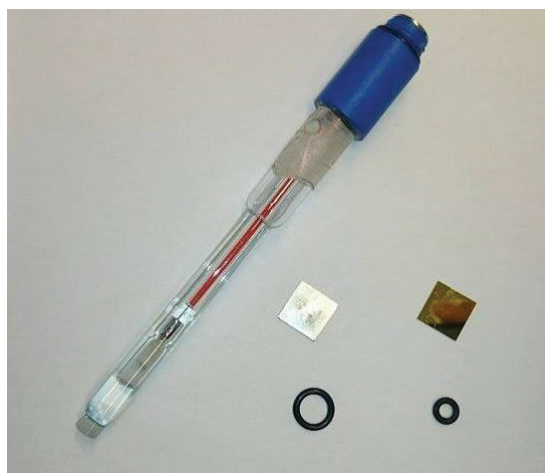


Figure II.10. Electrodes utilisées pour la mesure

Un potentiostat - galvanostat PGZ 402-voltalab 80 relié aux trois électrodes, nous permet de polariser l'électrode de travail par rapport à l'électrode de référence en surimposant une perturbation sinusoïdale de faible amplitude (pour toutes les expériences une valeur de 10 mV a été choisie).

Le pilotage et l'acquisition des paramètres expérimentaux se fait par l'intermédiaire d'un logiciel Volta Master 4. Le dispositif utilisé est présenté sur la Fig II.11.

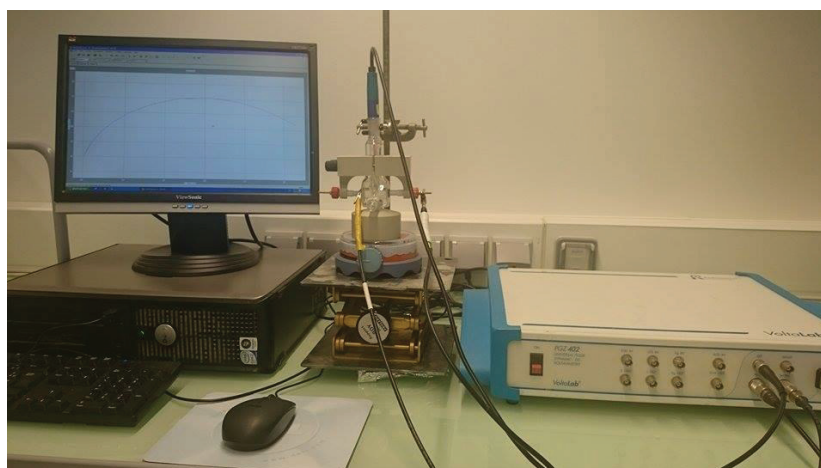


Figure II.11. Dispositif utilisé pour les mesures par spectroscopie d'impédance et voltampérométrie cyclique.

Dans le cas de l'analyse voltampérométrique, les mesures ont été réalisées à température ambiante dans un tampon phosphate salin (PBS) 10 mM à pH 7 en présence du couple redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. Le potentiel appliqué allait de -0,4 à 0,8 V avec une vitesse de balayage de 100 mV/s. Pour leur part, les mesures impédimétriques ont été effectuées dans une plage de fréquences comprise entre 100 mHz et 100 kHz dans une solution tampon PBS 10 mM à pH 7 en absence de toute sonde redox. Le tampon de travail est agité magnétiquement. Les données sont par la suite traitées par le logiciel EC-Lab (version 10).

Modélisation des spectres d'impédance

Dans notre cas, le modèle choisi pour les spectres de Nyquist obtenus pour l'électrode nue est un circuit électrique équivalent simple combinant la R_s , la R_p et la CPE (Fig II.12a). Par contre, ce modèle simple ne permet pas de rendre compte du diagramme de Nyquist des différentes électrodes modifiées. Le modèle de Randles qui inclut l'impédance de Warburg, Z_w , apparaît dans ce cas le plus adapté (Fig II.12b). C'est un paramètre qui traduit le phénomène de diffusion dû au transport de matière.

L'impédance $Z(\omega)$ s'exprime sous la forme :

$$Z(\omega) = \text{CPE}^{-1} (j\omega)^{-n}$$

où ω est une fréquence circulaire et n un paramètre qui varie de 0 à 1. Lorsque n est proche de 0, CPE est essentiellement une résistance. Si n est proche de 1, le CPE est une capacitance et l'électrode est considérée comme idéale [4]. La R_s n'est pas affectée par la modification chimique se produisant à la surface de l'électrode. En revanche, la CPE et la R_p dépendent des caractéristiques diélectriques et isolantes à l'interface.

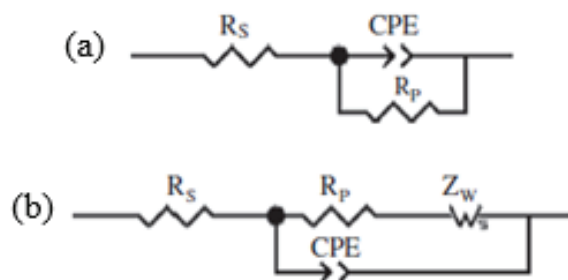


Figure II.12. Illustration des circuits équivalents utilisés : Circuit équivalent pour l'électrode d'or nu (a) pour les électrodes modifiées (b).

II.6. Application à des échantillons réels

L'huile d'olive vierge a été achetée dans un supermarché local et utilisée dopée ou non avec différentes concentrations d'OTA.

II.6.1. Analyse de l'OTA par le biocapteur conductimétrique

Chaque échantillon a été analysé en triplicata.

Essais avec le biocapteur TLN/BSA :

Différents volumes d'une solution de 20 mM d'OTA ont été ajustés à 1 mL avec de l'huile d'olive pour obtenir des concentrations de 0,825, 2,5 et 5 mM OTA. Ensuite, 20 μ L de chaque solution ont été injectés dans la cellule de mesure (5 mL) pour obtenir des concentrations finales de 3,3, 10 et 20 μ M OTA.

Essais avec le biocapteur TLN/ (PVA/PEI)/AuNPs :

A partir d'une solution initiale de 15 μ M d'OTA, différents volumes ont été ajoutés à 100 mL d'huile d'olive pour obtenir des concentrations de 1,25, 5 et 10 μ M d'OTA. Des volumes de 20 μ L de chaque solution ont été injectés dans la cellule de mesure de manière à obtenir des concentrations finales de 5, 20 et 40 nM d'OTA.

II.6.2. Evaluation de l'extraction de l'OTA à partir de l'huile d'olive

II.6.2.1. Préparation de la gamme d'étalonnage pour l'analyse de l'OTA par ELISA

Une gamme-étalon a été réalisée à partir d'une solution standard d'OTA 5 mM préparée dans le tampon phosphate 5 mM pH 7 / éthanol (50/50, v/v) (TPE). Par dilutions successives de cette solution, on obtient une solution de 0,5 μ M (S_1). La solution S_1 est utilisée pour préparer les solutions A à E comme indiqué dans le tableau ci-dessous.

	Volume de la S_1 (μ L)	Volume de TPE (μ L)	[OTA] (nM)
Solution A	15	135	50
Solution B	30	120	100
Solution C	60	90	200
Solution D	90	60	300
Solution E	120	30	400
Solution F	150	0	500

Une nouvelle dilution au vingtième des solutions par le TPE suivi par la dilution finale au dixième par le tampon de dilution du kit ELISA conduit à une gamme de concentrations finales comprises entre 0,25 et 2,5 nM.

II.6.2.2. Extraction de l'OTA à partir de l'huile d'olive

Pour extraire l'OTA, le protocole développé par Ferracane et *al.* a été adopté avec quelques modifications [5]. 20 μ L d'huile dopée sont versés dans une ampoule à décanter de 250 mL contenant 40 mL d'hexane. Le mélange est extrait trois fois avec 40 mL d'un mélange méthanol/eau (60/40, v/v) contenant 4% de NaCl. Les fractions sont combinées et le méthanol est évaporé sous pression réduite à 35 °C. Trois autres extractions successives de l'OTA à chaque fois sont effectuées en utilisant 40 mL de dichlorométhane (on agite 2 min et on laisse décanter 10 min à chaque fois). Les fractions de dichlorométhane sont combinées dans un flacon de 250 mL et évaporées de nouveau à sec dans un évaporateur rotatif à température ambiante.

II.6.2.3. Préparation des échantillons d'huile

Deux types d'échantillon ont été préparés :

- l'huile brute (H_B) qui sera dopée en OTA après l'extraction.
- l'huile dopée par différentes concentrations d'OTA avant l'extraction.

Ainsi, 100 μ L d'une solution d'OTA de 5, 50 et 500 μ M ont été ajoutés à 20 mL d'huile d'olive pour obtenir des concentrations finales en OTA de 0,25 μ M (H_1) et 2,5 μ M (H_2).

Après extraction, le résidu sec H_B est repris par 5 mL de solution TPE. Il est dopé par 100 μ L d'une solution d'OTA 50 μ M pour obtenir une concentration finale en OTA de 1 μ M.

A partir de cette solution, des dilutions successives dans le TPE sont réalisées pour obtenir une gamme de concentrations en OTA de 2,5 à 25 nM.

Après extraction, les résidus secs des huiles H₁ et H₂ sont repris par 5 mL de solution TPE. A partir de ces solutions, des dilutions successives dans le TPE sont réalisées pour obtenir une gamme de concentrations en OTA de 2,5 à 25 nM (en admettant que le taux de recouvrement est de 100%). Ainsi, la solution H₁ est diluée d'un facteur compris entre 40 et 200 fois et la solution H₂ entre 400 et 2000 fois.

Finalement, toutes les solutions sont diluées au dixième dans le tampon de dilution du kit ELISA pour obtenir des solutions finales de 0,25, 0,5, 1, 1,5, 2 et 2,5 nM.

Références

- [1] X. Fang, H. Ma, S. Xiao, M. Shen, R. Guo, X. Cao, Facile immobilization of gold nanoparticles into electrospun polyethyleneimine/polyvinyl alcohol nanofibers for catalytic applications, *J. Mater. Chem.* 21 (2011) 4493–4501.
- [2] J. Turkevich, P.C. Stevenson, J. Hillier, A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold, *Discuss. Faraday Soc.* 11 (1951) 55–75.
- [3] G. Frens, Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions, *Nature*. 241 (1973) 20–22.
- [4] E. Katz, I. Willner, Probing Biomolecular Interactions at Conductive and Semiconductive Surfaces by Impedance Spectroscopy: Routes to Impedimetric Immunosensors, DNA-Sensors, and Enzyme Biosensors, *Electroanalysis*. 15 (2003) 913–947.
- [5] R. Ferracane, A. Tafuri, A. Logieco, F. Galvano, D. Balzano, A. Ritieni, Simultaneous determination of aflatoxin B1 and ochratoxin A and their natural occurrence in Mediterranean virgin olive oil, *Food Addit. Contam.* 24 (2007) 173–180.

RESULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE III

RESULTATS ET DISCUSSION

Ce chapitre regroupe l'ensemble des résultats obtenus au cours de la thèse et décrit les différentes étapes de l'élaboration du biocapteur enzymatique, allant du choix du biorecepteur jusqu'à la détection de l'OTA dans des échantillons réels.

III.1. Choix de l'élément de reconnaissance

Une étude comparative de deux enzymes, la thermolysine (TLN) et la carboxypeptidase Y (CPY) a tout d'abord été réalisée afin de sélectionner l'outil de reconnaissance montrant les meilleures performances analytiques dans des conditions d'immobilisation classique (réticulation en présence de BSA à l'aide vapeurs de glutaraldéhyde (GA)) et en utilisant les électrodes (interdigitées en or) et le mode de détection (conductimétrie) envisagés pour le biocapteur final (voir description des électrodes, du mode opératoire détaillé de leur fonctionnalisation et du mode de détection en section II.3). Pour ce faire, différents paramètres pouvant affecter l'immobilisation des enzymes, leur stabilité et leur activité (temps de réticulation, température et pH) ont été optimisés et les performances (reproductibilité, stabilité, domaine de linéarité et limite de détection) des deux biocapteurs ont été déterminées dans les conditions optimales. Cette étude a permis la sélection d'une enzyme dont les capacités à analyser des échantillons d'une huile d'olive dopée ont ensuite été évaluées.

III.1.1. Optimisation du signal des biocapteurs

Plusieurs paramètres peuvent influencer la réponse du biocapteur en modulant l'activité enzymatique de l'élément de reconnaissance, en affectant la stabilité ou la perméabilité de la biomembrane, ou en modifiant les propriétés électriques de l'interface

électrode/électrolyte. Dans cette première partie, nous avons examiné l'influence d'un paramètre lié à la formation de la biomembrane (temps de réticulation par les vapeurs de GA) et de deux paramètres de mesure (température et pH de l'électrolyte) sur la réponse des deux biocapteurs (TLN/BSA et CPY/BSA).

III.1.1.1. Temps de réticulation

Le temps de réticulation est un paramètre important qui affecte la stabilité et la perméabilité des membranes des biocapteurs. Afin de définir les conditions optimales de réticulation, trois électrodes ont été préparées par biocapteur en faisant varier le temps d'exposition aux vapeurs de GA de 15 à 60 minutes. Indépendamment de la nature de l'enzyme immobilisée sur le transducteur, la réponse des biocapteurs à l'équilibre, ΔG_{ss} , enregistrée après injection de 10 μM d'OTA, augmente avec le temps de réticulation pour atteindre un maximum à 35 min puis diminue au-delà de cette valeur (Fig III.1). Les faibles signaux observés pour la plus courte durée d'exposition (15 min) peuvent être attribués au relargage des enzymes dû à une réticulation insuffisante. L'augmentation de la durée d'exposition à 35 min conduit à la formation d'un réseau polymérique plus dense, ce qui limite la libération et la flexibilité des enzymes et améliore la réponse des capteurs. Une réticulation excessive peut provoquer des modifications conformationnelles des enzymes, voire leur dénaturation, et par conséquent leur inactivation expliquant ainsi la forte baisse du signal observé au-delà de 35 min. Compte tenu de ces résultats, un temps d'exposition de 35 min a été choisi pour les expériences ultérieures.

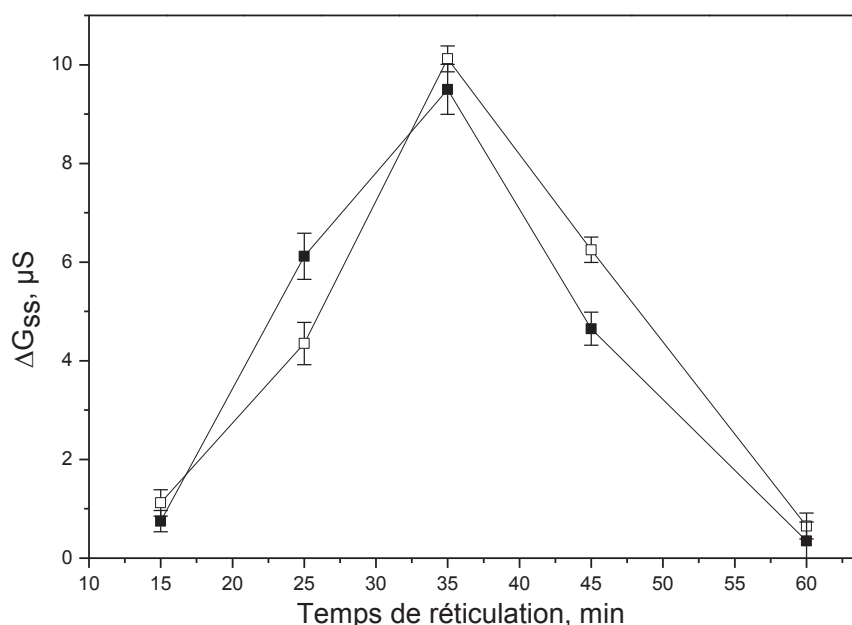


Figure III.1. Effet du temps de réticulation sur la réponse des biocapteurs conductimétriques CPY/BSA (■) et TLN/BSA (□)

; [OTA] = 10 μM ; Tampon phosphate 5 mM, pH 7.0 ; température 25 ± 2 °C ; n=3.

III.1.1.2. pH

Le pH optimal est la valeur du pH du milieu de mesure pour laquelle l'enzyme est la plus active. La gamme de pH optimal varie selon les enzymes et selon leur état (immobilisées ou en solution). Par conséquent, il est important d'optimiser ce paramètre. Pour ce faire, trois électrodes fonctionnalisées de chaque type de biocapteur ont été préparées et les mesures ont été effectuées à différentes valeurs de pH allant de 5 à 9, pour une concentration de 5 μM d'OTA. Comme on le voit sur la Fig III.2, la réponse du biocapteur CPY/BSA est maximale dans la gamme de 5,5 à 7 puis diminue fortement au-delà de pH 7. Ces résultats sont à rapprocher de ceux obtenus en solution. Ainsi, Abrunhosa *et al.* ont observé une activité optimale de dégradation de l'OTA à pH 5,6 et à 37 °C [1], tandis qu'une valeur de 6,5 a été obtenue par Hayashi *et al.* pour l'hydrolyse du peptide benzyloxycarbonyl-Gly-Phe (Z-Gly-Phe) à 25 °C [2]. On constate donc que la CPY, même réticulée sur l'électrode, conserve une activité élevée à pH acide, la gamme de pH optimal étant néanmoins plus large que celle de l'enzyme libre.

En ce qui concerne la TLN, la plage optimale de pH est de 6 à 8, donc légèrement décalée vers des valeurs de pH plus élevées que celles obtenues pour la CPY. Ce résultat est cohérent avec des travaux précédents qui ont démontré que la TLN en solution a une activité maximale à pH 7 pour l'hydrolyse d'oligopeptides synthétiques tels que le Z-Gly-Leu-Ala à 40 °C [3]. Toutefois, comme déjà remarqué pour la CPY libre, et contrairement à l'enzyme immobilisée, l'activité de la TLN diminue de manière significative lorsque le pH dévie légèrement de la valeur maximale (pH 8). Le décalage et / ou l'élargissement de la gamme de pH optimal lors de l'immobilisation d'une enzyme ont été déjà signalés et peuvent être attribués à la diminution de la flexibilité de l'enzyme et à la différence entre le pH de la solution et le pH à l'interface électrode/électrolyte, ou bien au pouvoir tampon de l'enzyme.

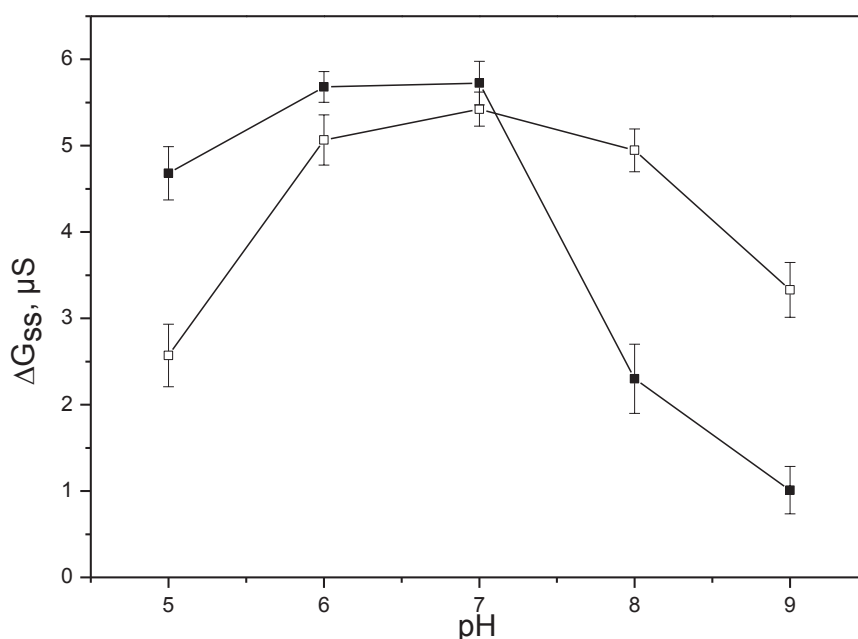


Figure III.2. Effet du pH sur la réponse des biocapteurs conductimétriques CPY/BSA (■) et TLN/BSA (□)

[OTA] = 5 μM ; Tampon phosphate 5 mM ; température 25 \pm 2 °C ; n=3.

III.1.1.3. Température

Dans une autre série d'expériences, nous avons étudié l'influence de la température sur la réponse des deux biocapteurs CPY/BSA et TLN/BSA dans la gamme de 10 à 50 °C. Comme le montre la Fig III.3, la plage de température optimale est respectivement de 20 à 40 °C et de 20 à 30 °C pour la TLN et la CPY immobilisées. La TLN immobilisée semble garder son activité pour une plus large plage de température. Une forte baisse est observée en dehors de cette plage, moins de 30% du signal maximal des deux biocapteurs étant retrouvés à 15 °C et à 50 °C. Lewis et Schuster ont étudié la stabilité thermique de la CPY en solution à pH 7,5 en incubant l'enzyme pendant différents temps à 25 °C ou 37 °C avant de mesurer son activité. Ces auteurs ont montré que l'enzyme gardait son activité à 25°C et ont observé une perte d'activité à 37°C, celle-ci étant d'autant plus forte que le temps d'incubation augmente [4]. La stabilité thermique de la CPY n'a donc pas été améliorée par son immobilisation. Le signal du biocapteur à base de TLN diminue, quant à lui, très fortement à partir de 40°C. Cette enzyme est pourtant connue pour être l'une des métallopeptidases les plus stables thermiquement en solution, et pour être capable par exemple de conserver 50% de son activité après 30 minutes d'incubation à 86,9 °C [5]. La hausse importante du signal entre 10 et 20 °C semble être en relation avec l'énergie d'activation de la réaction enzymatique alors que la baisse significative du signal des biocapteurs observée à températures relativement hautes peut être attribuée au procédé d'immobilisation ou à la dégradation de l'OTA ou encore à sa liaison à la biomembrane [6].

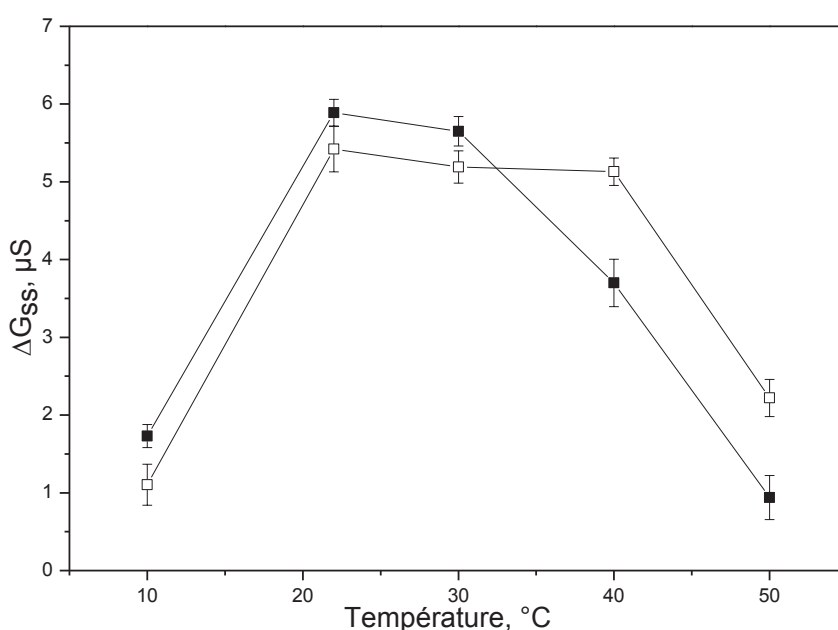


Figure III.3. Effet de la température sur la réponse des biocapteurs conductimétriques CPY/BSA (■) et TLN/BSA (□).

[OTA] = 5 μM ; Tampon phosphate 5 mM pH 7 ; n=3.

III.1.2. Cinétiques enzymatiques

Afin d'étudier les cinétiques d'hydrolyse de l'OTA par la TLN et la CPY à diverses concentrations de substrat (10-150 μM), la vitesse initiale de la réaction, supposée être proportionnelle à $V_i = d(\Delta G)/dt$ à $t = 0$, a été déduite de la première partie linéaire de la réponse du biocapteur. Comme la montre la Fig III.4, la représentation $1/V_i$ vs $1/[OTA]$ est linéaire, montrant un comportement Michaélien des deux enzymes immobilisées. Les paramètres cinétiques, c'est-à-dire la vitesse maximale apparente (V_{max}^{app}) et la constante de Michaelis apparente (K_M^{app}), ont été calculés à partir de la pente et de l'ordonnée à l'origine des droites de régression correspondant à la représentation de Lineweaver-Burk $1/V_i$ vs $1/[OTA]$ (Eq. 2).

$$\frac{1}{V_i} = \frac{1}{V_{max}^{app}} + \frac{K_M^{app}}{V_{max}^{app}} \times \frac{1}{[OTA]} \quad (\text{Eq.2})$$

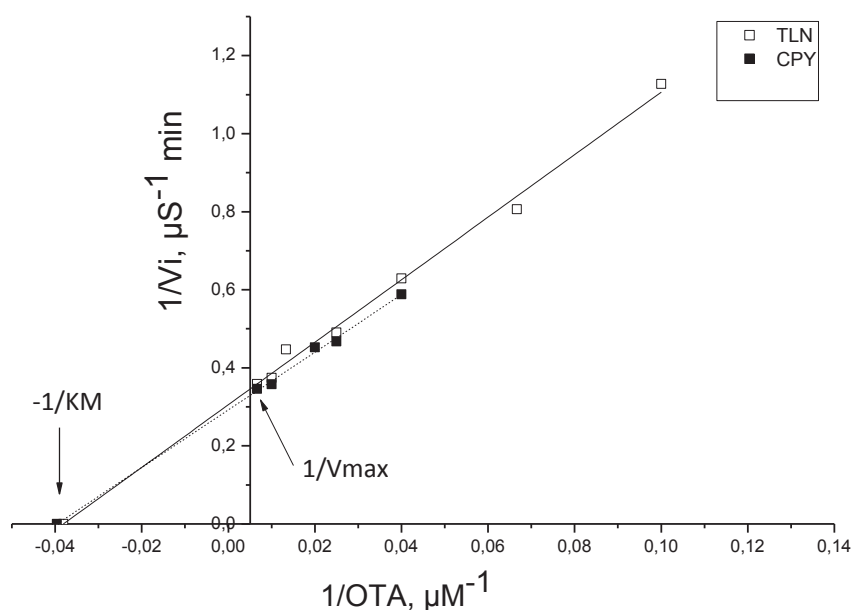


Figure III.4. Représentations de Lineweaver Burk pour la réaction d'hydrolyse de l'OTA par la TLN et la CPY.

On constate que les deux enzymes conduisent à des résultats similaires, l'équation des droites de régression étant $\frac{1}{v_i} = 8.012 \frac{1}{[OTA]} + 0.305$ pour la TLN et $\frac{1}{v_i} = 7.382 \frac{1}{[OTA]} + 0.292$ pour la CPY. Les valeurs des paramètres cinétiques obtenues pour TLN ($K_M^{app} = 26 \mu\text{M}$ et $V_{max}^{app} = 3,3 \mu\text{S} \cdot \text{min}^{-1}$) sont très proches de celles calculées pour la

CPY ($K_M^{app} = 25 \mu\text{M}$ et $V_{max}^{app} = 3,4 \mu\text{S}\cdot\text{min}^{-1}$). La Fig III.5 compare les courbes issues de la modélisation aux données expérimentales.

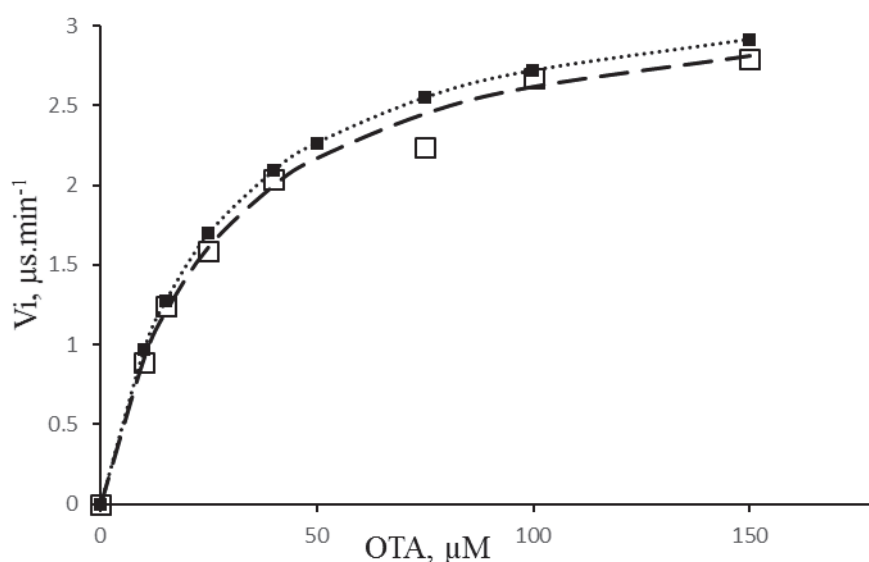


Figure III.5. Evolution de la vitesse initiale (V_i) en fonction de la concentration en OTA.

■ biocapteur CPY/BSA ; □ biocapteur TLN/BSA. Les courbes modèles sont représentées en pointillés

Les constantes de Michaelis apparentes obtenues pour la TLN et la CPY immobilisées sont inférieures à celles rapportées dans la littérature pour d'autres hydrolases libres, telles que la chymotrypsine ou la carboxypeptidase A (CPA) (Tab III.1). Cela pourrait indiquer que les deux enzymes, une fois réticulées, possèdent une plus grande affinité pour l'OTA que leurs analogues libres. Cependant, les forts écarts entre les différentes valeurs de K_M rapportées dans la littérature pour la CPA libre, soulignent la difficulté à déterminer et comparer ce paramètre d'une étude à l'autre, les différences observées ne peuvent être totalement expliquées par des différences entre les conditions expérimentales telles que la température ou bien la composition du tampon [7–9].

La similitude des valeurs des paramètres cinétiques obtenues pour les deux enzymes immobilisées peut paraître surprenante mais peut s'expliquer par le fait que la vitesse globale mesurée ne dépend pas uniquement de la réaction enzymatique mais également de la vitesse de diffusion du substrat vers le site catalytique de l'enzyme et de la diffusion des produits de la réaction vers le milieu réactionnel.

Tableau III.1 : Affinité de diverses hydrolases pour l'OTA.

Enzyme	pH	température	K_M (mM)	Référence
TLN immobilisée	7,0	25 °C	0,026*	Ce travail
CPY immobilisée	7,0	25 °C	0,025*	Ce travail
Chymotrypsine libre	7,5	25 °C	1,0	[9]
CPA libre	7,5	25 °C	0,15	[7–9]
	7,5	25 °C	0,081	
	7,5	37 °C	1,1	
Hydrolase isolée de <i>A. niger</i>	7,5	37 °C	0,5	[7]

* valeurs de K_M^{app} pour les enzymes immobilisées.

III.1.3. Caractéristiques analytiques des biocapteurs

III.1.3.1. Linéarité et sensibilité

La linéarité et la sensibilité des deux biocapteurs TLN/BSA et CPY/BSA ont été étudiées à partir de l'analyse de plusieurs solutions étalons d'OTA dans la gamme de concentrations 5 - 150 μM . Trois mesures ont été effectuées pour chaque concentration. Une augmentation de la variation de conductance à l'équilibre, ΔG_{ss} , a été observée dans les deux cas lors de l'addition de quantités croissantes d'OTA (Fig III.6). Les deux biocapteurs ont montré une réponse très similaire. Leurs réponses augmentent linéairement avec la concentration en OTA jusqu'à 75 μM . L'équation de la droite de régression et le coefficient de détermination R^2 sont $\Delta G_{ss} (\mu\text{S}) = 0,8059 \times [\text{OTA}] (\mu\text{M}) + 2,5448$ et 0,997, respectivement, pour le biocapteur TLN/BSA, alors qu'ils sont $\Delta G_{ss} (\mu\text{S}) = 0,755 \times [\text{OTA}] (\mu\text{M}) + 1,5413$ et 0,996 pour le biocapteur CPY. La limite de détection est de 1 μM pour le biocapteur CPY/BSA et légèrement plus faible pour le biocapteur TLN (0,7 μM).

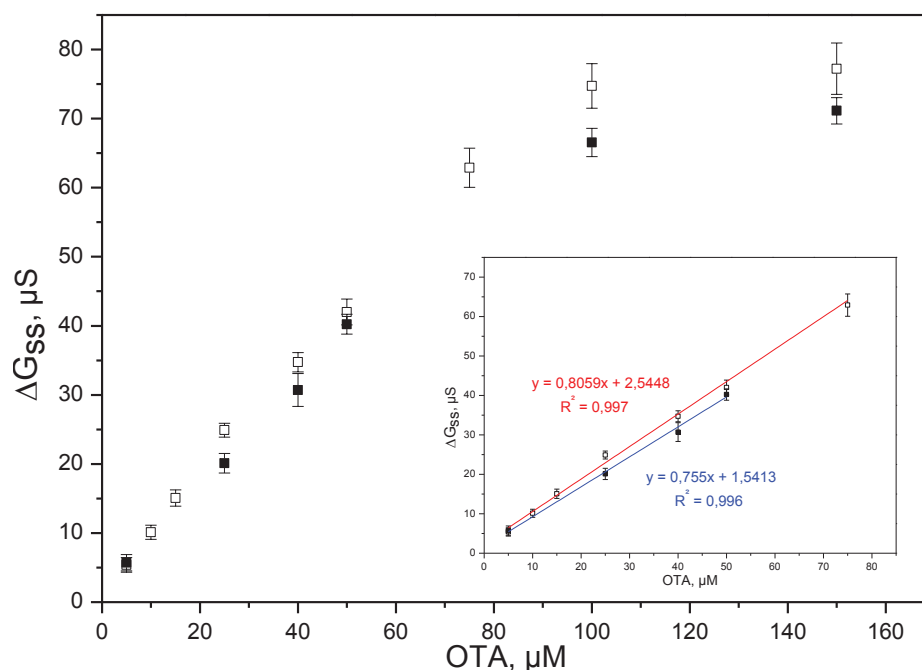


Figure III.6. Evolution de la réponse des biocapteurs en fonction de la concentration d'OTA dans les conditions optimales.

■ biocapteur CPY/BSA ; □ biocapteur TLN/BSA ; n=3.

Dans la littérature, les seuls biocapteurs enzymatiques développés pour le dosage de l'OTA utilisent la peroxydase (HRP) [10,11]. Ils possèdent une linéarité et une limite de détection de l'ordre du nM. Les biocapteurs TLN/BSA et CPY/BSA développés dans cette première partie du travail sont donc moins sensibles mais ils offrent l'avantage d'être plus simples et plus robustes et ils permettent par ailleurs la détection directe de l'OTA.

III.1.3.2. Temps de réponse

D'une manière générale, le temps de réponse du biocapteur doit être aussi court que possible pour une application en routine. L'évolution du temps de réponse des biocapteurs TLN/BSA et CPY/BSA (voir Fig II.9) avec la concentration en OTA est présentée dans la Fig III.7. Des résultats similaires ont été enregistrés pour les deux enzymes, avec une valeur maximale de 25 min obtenue pour 150 μM d'OTA. Dans la gamme linéaire, le temps de réponse est inférieur à 20 min.

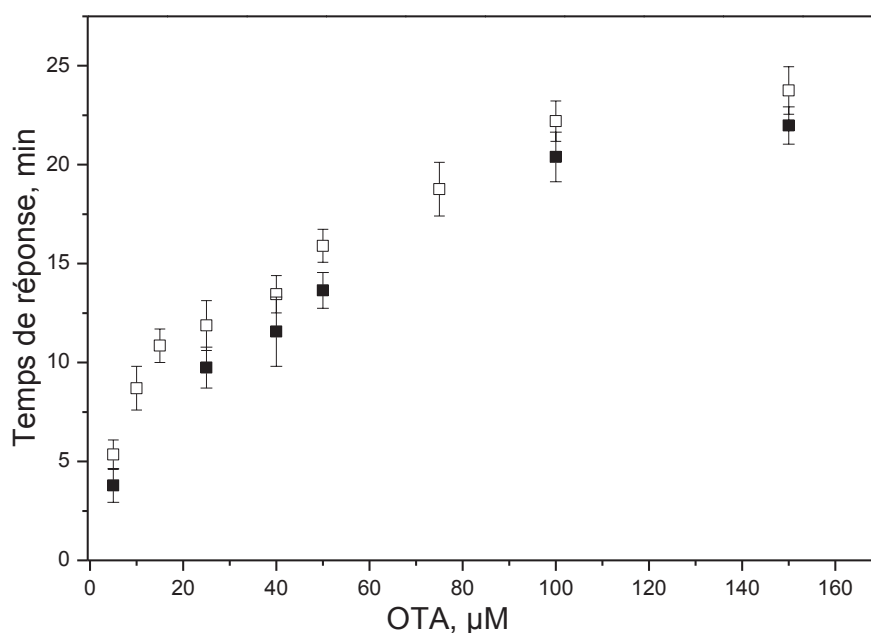


Figure III.7. Evolution du temps de réponse des biocapteurs en fonction de la concentration en OTA

■ biocapteur CPY/BSA ; □ biocapteur TLN/BSA ; n=3.

III.1.3.3. Reproductibilité intra- et inter-biocapteurs

La reproductibilité intra-capteur a été calculée à partir de trois mesures effectuées à chaque niveau de concentration en OTA, ceci dans la même journée et avec le même capteur. Les coefficients de variation obtenus sont excellents car ils varient entre 1 et 5% dans la gamme de concentration étudiée (5-150 μM). La reproductibilité inter-capteurs a quant-à-elle été étudiée en utilisant trois électrodes différentes. Le coefficient de variation varie de 4 à 20% pour le biocapteur TLN/BSA et de 3 à 25% pour le biocapteur de CPY/BSA, indiquant une bonne reproductibilité inter-capteurs pour les deux types d'électrodes modifiées dans l'intervalle de concentrations étudié.

III.1.3.4. Stabilité de stockage

La stabilité de stockage des biocapteurs CPY/BSA et TLN/BSA a ensuite été déterminée. Trois électrodes modifiées de chaque type ont été fabriquées dans les conditions optimales indiquées précédemment et leurs réponses ont été évaluées à intervalles de temps irréguliers pendant 30 jours. Entre les mesures, les électrodes ont été rincées avec de l'eau ultra pure et conservées à + 4 °C dans du tampon phosphate 20 mM pH 7. Comme le montre la Fig III.8, les deux biocapteurs sont stables sur une longue période. Un pourcentage de 5% seulement de la valeur initiale de la réponse a été perdue après 15 jours, et environ 90% de la réponse est préservée après 30 jours. Cette légère diminution de la réponse des biocapteurs peut être attribuée à la diminution progressive de l'activité enzymatique immobilisée.

Il est généralement admis que les biocapteurs à base d'enzyme ou d'anticorps sont moins stables que les aptacapteurs [12] ou encore les biocapteurs à empreintes moléculaires

[13]. Cependant, nous avons démontré dans ce travail que la co-réticulation du biorécepteur (TLN ou CPY) en présence de BSA avec du glutaraldéhyde permettait de stabiliser les enzymes et de préserver leur activité sur une longue période.

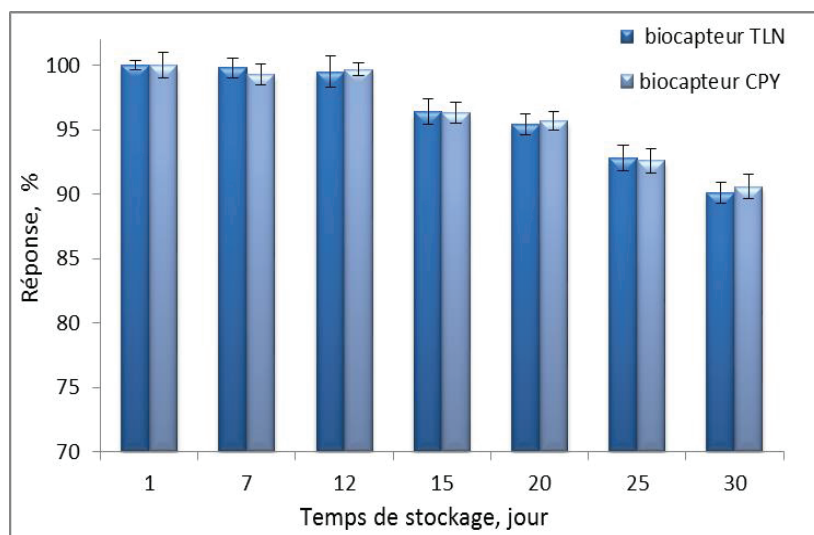


Figure III.8. Stabilité des biocapteurs sur une période de 30 jours de stockage.

Stockage à 4°C dans du tampon phosphate 20 mM pH 7 entre deux mesures.

III.1.4. Détermination de l'OTA dans des échantillons d'huile d'olive

Nous venons de voir que les biocapteurs TLN/BSA et CPY/BSA présentent des performances analytiques similaires. Aussi, on peut s'attendre à ce que l'utilisation de l'un ou de l'autre pour la quantification de l'OTA dans des échantillons réels conduise à des résultats similaires. Le coût de la TLN commerciale étant beaucoup moins élevé que celui de la CPY, nous avons donc décidé de sélectionner la TLN comme élément de biorecognition et le biocapteur TLN/BSA a été utilisé pour évaluer sa capacité à quantifier l'OTA dans des échantillons d'huile d'olive. Pour ce faire, un échantillon d'huile d'olive commerciale a été enrichi à trois niveaux de concentration (0,82 ; 2,5 et 5 mM OTA). Des volumes de 20 μ L de chacun des échantillons enrichis ou non dopés ont été injectés dans la cellule électrochimique de 5 mL. Toutes les mesures ont été effectuées le même jour, de manière à ce que la stabilité inter-jours n'ait pas d'incidence sur les résultats. La concentration totale en OTA est directement déduite de la courbe d'étalonnage présentée sur la Fig III.6. Aucune réponse n'a pu être enregistrée dans l'échantillon brut, montrant que la concentration de l'OTA dans l'échantillon d'huile commerciale est inférieure à 0,175 mM (compte tenu de la dilution apportée par l'injection de 20 μ L de l'échantillon dans la cellule électrochimique de 5 mL). Les résultats des trois échantillons dopés sont donnés dans le tableau suivant (Tab III.2). Il est à noter que les taux de recouvrement obtenus sont proches de 100%, ce qui démontre l'applicabilité du biocapteur à l'analyse de l'OTA dans l'huile d'olive. Il est intéressant de noter que ces essais ont été effectués sans aucun prétraitement de l'échantillon, l'OTA étant directement libérée dans le tampon à partir de la goutte d'huile non miscible.

Tableau III.2. Analyse des échantillons d'huile d'olive dopés avec de l'OTA

Concentration ajoutée (mM)	Concentration détectée (mM)	Taux de recouvrement (%) ± S.D
0,82	0,80	97 ± 3
2,50	2,40	96 ± 2
5,00	4,95	99 ± 2

III.1.5. Conclusion

Deux enzymes, la CPY et la TLN, ont été utilisées pour la première fois comme éléments de reconnaissance pour développer un biocapteur électrochimique pour la détection et la quantification de l'OTA. Les enzymes ont été déposées sur des microélectrodes interdigitées d'or et réticulées dans des vapeurs de glutaraldéhyde pendant 35 min. Pour les deux dispositifs, une relation linéaire a pu être démontrée entre la réponse à l'équilibre et la concentration en OTA dans la gamme de 5 à 75 μM . Lorsque les conditions expérimentales optimales (à savoir à pH 7 et à 25 °C) sont appliquées, des sensibilités et des limites de détection similaires sont obtenues : 0,755 $\mu\text{S } \mu\text{M}^{-1}$ et 1 μM pour le biocapteur CPY/BSA et 0,806 $\mu\text{S } \mu\text{M}^{-1}$ et 0,7 μM pour le biocapteur TLN/BSA. Les données cinétiques sont compatibles avec le modèle de Michaelis-Menten et les valeurs des paramètres cinétiques apparents obtenus pour la TLN ($K_M^{\text{app}} = 26 \mu\text{M}$ and $V_{\text{max}}^{\text{app}} = 3,3 \mu\text{S} \cdot \text{min}^{-1}$) sont quasiment les mêmes que celles calculées pour la CPY ($K_M^{\text{app}} = 25 \mu\text{M}$ and $V_{\text{max}}^{\text{app}} = 3,4 \mu\text{S} \cdot \text{min}^{-1}$). Dans nos conditions, les réponses à l'équilibre des biocapteurs sont atteintes en moins de 25 min, un temps suffisamment court pour envisager une détection en routine de l'OTA. En outre, une stabilité à long terme de 30 jours et des résultats d'intra- et inter-reproductibilités satisfaisants ont été observées. Tenant compte de leurs activités spécifiques similaires et du moindre coût de la TLN commerciale, le biocapteur TLN/BSA a été choisi pour quantifier l'OTA dans des échantillons d'huile d'olive commerciale. Aucun prétraitement de l'échantillon n'a été effectué avant l'analyse et des taux de recouvrement proches de 100% ont été obtenus aux trois niveaux de dopages étudiés. Ceci démontre la pertinence de la méthode pour la détermination directe de l'OTA dans un tel échantillon complexe.

Les teneurs maximales autorisées en OTA sont comprises entre 0.5 et 30 $\mu\text{g/kg}$ pour la plupart des denrées alimentaires (céréales, grains de café, vin, fruits sec ...) mais la teneur maximale autorisée dans l'huile d'olive ne fait pas encore l'objet d'une réglementation. Si on propose une valeur moyenne de 10 $\mu\text{g/kg}$ et qu'on considère que la densité de l'huile est proche de 1, le biocapteur proposé dans cette première partie du travail possède une limite de détection 7000 fois trop élevée pour permettre la détection de l'OTA dans les échantillons d'huile d'olive. Nous avons donc essayé de mettre en œuvre différentes approches afin d'abaisser de manière significative cette valeur.

III.2. Amélioration de la limite de détection du biocapteur

III.2.1. Pré-concentration de l'échantillon

Une première stratégie consiste à concentrer les échantillons d'huile d'olive par extraction afin de pouvoir ensuite utiliser le biocapteur précédemment développé. Pour atteindre directement le facteur de pré-concentration visé, et si le volume de récupération est fixé à 5 mL, il faudrait extraire 35 litres d'huile d'olive, ce qui n'est pas réalisable d'un point de vue pratique. Nous avons néanmoins exploré la piste de l'étape de pré-concentration car elle permettra quoi qu'il en soit d'améliorer la limite de détection du biocapteur et elle s'accompagne d'une purification de l'échantillon potentiellement intéressante pour l'élimination des interférents. La méthode d'extraction envisagée s'inspire d'un protocole décrit dans la littérature et conduit à un facteur de pré-concentration de 4 (voir détail en section II.6). Des échantillons d'huile dopée à 0,25 et 2,5 μM d'OTA ont été extraits et les rendements d'extraction calculés par dosage des extraits à l'aide d'un kit enzymatique commercial de type ELISA.

III.2.1.1. Dosage de l'OTA par la méthode ELISA

Afin d'être sûr qu'aucun effet de matrice n'affecte la méthode de dosage de l'OTA dans les extraits, nous avons préparé deux séries d'étalons dans une gamme de concentrations comprises entre 0,25 et 2,5 nM, la première préparée à partir d'une solution mère diluée dans le tampon phosphate 5 mM pH7/éthanol (TPE) et le tampon de dilution du kit ELISA, la deuxième préparée à partir d'huile brute extraite dopée à l'OTA puis diluée de la même façon.

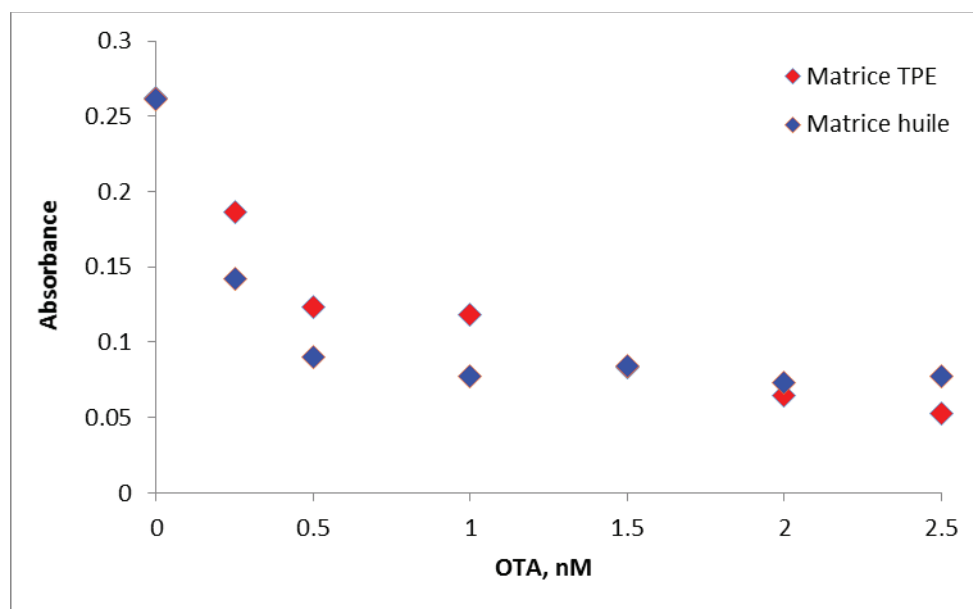


Figure III.9. Variation de l'absorbance à 450 nm en fonction de la concentration en OTA.

En se basant sur la Fig III.9, on constate que les deux courbes étalons sont pratiquement confondues. Il n'y a donc pas d'effet de matrice significatif et la courbe d'étalonnage préparée dans le tampon TPE a pu être utilisée pour la quantification de l'OTA dans les extraits d'échantillons dopés.

III.2.1.2. Taux de recouvrement

Les extraits bruts obtenus à partir des deux échantillons dopés à 0,25 μM (2 μg OTA) et 2,5 μM (20 μg OTA) ont été dilués comme décrit dans la partie II.6 afin d'obtenir, pour chaque extrait brut, 4 solutions de concentrations théoriques en OTA comprises entre 1 et 2,5 nM (domaine linéaire de fonctionnement du kit ELISA).

Tableau III.3 : Rendements d'extraction déterminés sur les échantillons d'huile dopés avec 2 et 20 μg d'OTA

	[OTA] calculé (nM)	[OTA] mesuré (nM)	Rendement d'extraction (%)	Moyenne
Echantillon dopé à 2 μg OTA	1	0,88	88,3	84,8 \pm 3,3
	1,5	1,23	82,3	
	2	1,76	87,8	
	2,5	2,02	80,9	
Echantillon dopé à 20 μg OTA	1	0,82	81,8	87,7 \pm 12,6
	1,5	1,22	81,7	
	2	2,19	109	
	2,5	1,95	78,1	

Selon le tableau III.3., les rendements d'extraction sont de l'ordre de 85% pour les deux échantillons d'huile dopée et sont assez reproductibles, nous permettant d'envisager cette étape d'extraction/préconcentration en amont de la détermination du biocapteur (si nécessaire). Il serait néanmoins nécessaire d'effectuer des essais à des concentrations plus faibles et en augmentant le volume d'huile prélevé afin d'améliorer le facteur de préconcentration. Cette étude étant cependant longue et l'introduction d'une étape d'extraction rendant le processus d'analyse à la fois plus long, plus coûteux et générateur de pertes d'OTA parfois difficiles à contrôler en milieux complexes, nous avons décidé de nous arrêter à la démonstration de sa faisabilité et de concentrer nos efforts sur une autre approche consistant à modifier la composition et le mode d'élaboration de la biomembrane du biocapteur afin d'en améliorer les performances.

III.2.2. Evaluation d'une nouvelle méthode d'immobilisation

La nouvelle méthode d'immobilisation proposée consiste à piéger l'enzyme dans un film hybride de polymères alcool polyvinylique/poly(éthylènimine) (PVA/PEI) en présence de nanoparticules d'or (AuNPs). Ces deux polymères, solubles dans l'eau, améliorent l'activité enzymatique en la protégeant de la dénaturation et augmente la porosité de la

matrice, réduisant ainsi les contraintes de diffusion, [14]. En outre, les interactions existant entre les groupements amines protonés du PEI et les charges négatives à la fois de la thermolysine ($pI = 5,1$) et des AuNPs citratées contribuent à améliorer la dispersion du biorécepteur et des AuNPs dans le réseau polymérique. Par conséquent, la stabilisation de l'enzyme et l'accessibilité du substrat sont favorisées. La stabilité de la membrane dans l'eau est obtenue grâce à la réticulation de la biomembrane hybride par le glutaraldéhyde et le transfert des électrons est amélioré par l'incorporation des AuNPs.

Dans la nouvelle méthode proposée, la solution aqueuse contenant le mélange TLN/PVA/PEI est déposée en film mince par spin-coating sur la surface de l'électrode en or carrée puis réticulée par des vapeurs de GA (section II.3). Les propriétés électrochimiques de l'électrode modifiée ont été étudiées par voltammétrie cyclique (CV) et la détection de l'OTA a été testée par spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS).

Les AuNPs utilisées dans le travail ont été synthétisées au Laboratoire Hubert Curien de Saint-Etienne suivant le protocole décrit dans la section II.1. Leur caractérisation microscopique par imagerie TEM, après leur déposition et évaporation à sec sur une grille de cuivre recouverte d'une membrane de Formvar et de carbone, révèle un diamètre moyen des nanoparticules de l'ordre de 23 ± 5 nm (Fig III.10). Les images ont été traitées à l'aide du logiciel « ImageJ ».

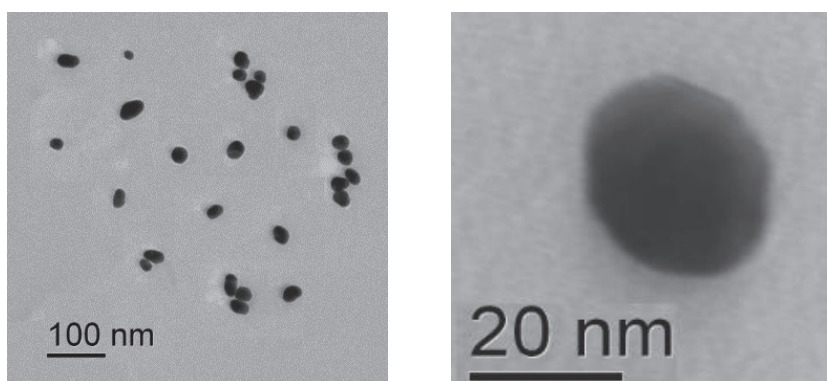


Figure III.10. Images TEM des nanoparticules d'or synthétisées

III.2.2.1. Caractérisation des biomembranes par imagerie AFM

L'influence du mode d'immobilisation de la TLN sur la topographie de la surface du capteur TLN/AuNPs/(PVA/PEI) a, tout d'abord, été étudiée par AFM. Une zone centrale de $0,5 \text{ cm}^2$ de l'électrode a été explorée par l'analyse de 200 spots de $25 \text{ }\mu\text{m}^2$ chacun. La même procédure a été utilisée pour caractériser la surface du substrat nue et après dépôt d'un biofilm à base de TLN/BSA. Dans le cas de l'électrode nue, une surface granulaire homogène avec des particules globulaires d'environ 50 nm de diamètre a été observée (Fig III.11.a). L'électrode d'or recouverte de la biomembrane à base de TLN/AuNPs/(PVA/PEI) révèle une surface organisée et homogène avec des structures tubulaires de 1250 ± 120 nm de longueur, 397 ± 11 nm de largeur et de 309 ± 50 nm de hauteur (Fig III.11.b). Environ 120 structures de ce type ont été trouvées par spot de $25 \text{ }\mu\text{m}^2$. L'agencement tubulaire adopté correspond à des arrangements de polymères réticulés encapsulant les nanoparticules d'or et l'enzyme. Ces

assemblages résultent des interactions entre les groupements amines protonés du PEI et les charges négatives des nanoparticules d'or citratées et de la thermolysine [15]. Le remplacement du mélange de polymères par la BSA et le glycérol confère à la surface une organisation différente, mais elle garde un aspect homogène (Fig III.11.c). Dans ce cas, on observe des structures de type globulaire avec une hauteur moyenne de 269 ± 22 nm et un diamètre moyen de 397 ± 24 nm. La BSA est une protéine globulaire ayant des dimensions approximatives de 4 nm x 4 nm x 14 nm. Son adsorption sur divers substrats comme l'or [16], le mica [17] ou les polymères [18] a été étudiée et caractérisée par AFM. La morphologie observée est très variable. Elle dépend de la nature du substrat et de la concentration en BSA. Récemment, Jasti *et al.* ont rapporté la formation d'agrégats lors de la réticulation de la trypsine sur un support de polymère revêtu de BSA. L'imagerie de la surface par AFM en présence de BSA seule montre la formation d'amas de 180-230 nm de largeur et de 55 nm de hauteur en moyenne, tandis que la fixation ultérieure de la trypsine produit l'accroissement de la taille de ces amas de 700-900 nm de largeur et de 90 nm de hauteur [19]. Dans notre travail, la BSA et la TLN ne sont pas séquentiellement adsorbées mais réticulées en même temps sur l'électrode. Toutefois, les structures de type globulaire observées peuvent résulter de la formation d'agrégats de TLN et de BSA réticulés car des solutions de protéines hautement concentrées (5% m/v) ont été utilisées.

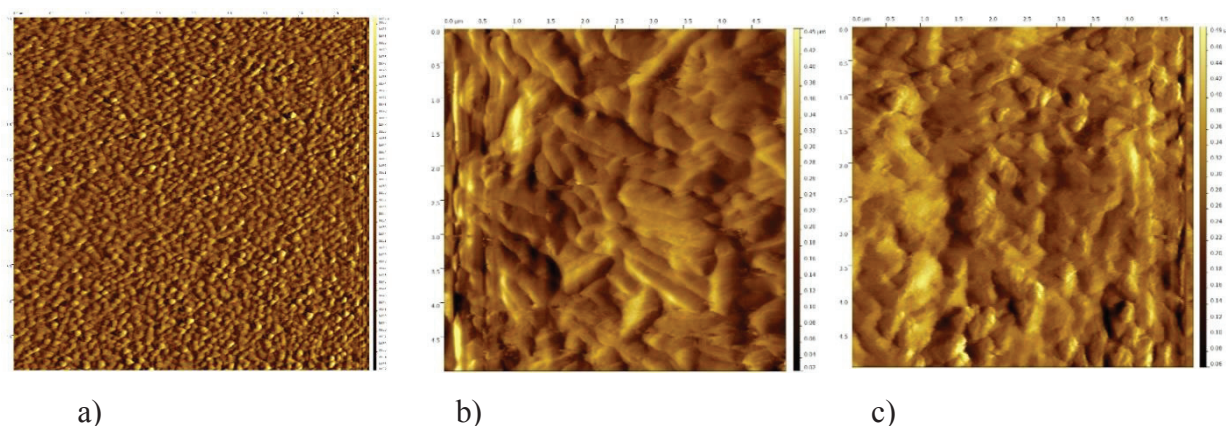


Figure III.11. Images AFM ($5 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$) de l'électrode en or nue (a), biomembranes TLN/AuNPs/(PVA/PEI) (b) et TLN/BSA (c).

III.2.2.2. Caractérisation préliminaire des électrodes fonctionnalisées par CV

La voltammétrie cyclique est une technique analytique efficace couramment utilisée pour mettre en évidence les modifications de la surface de l'or. Elle fournit des données rapides et simples sur la capacité des électrons des espèces redox en solution à traverser la membrane et à atteindre la surface de l'or. De ce fait, chaque modification de la surface va influencer les pics d'oxydo-réduction. Dans notre cas, le couple redox réversible $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3/4-}$ a été sélectionné en tant que sonde redox et les mesures ont été réalisées dans une solution tampon de PBS 10 mM, pH 7 dans un intervalle de potentiels allant de -0,4 V jusqu'à +0,8 V avec une vitesse de balayage de 100 mV/s.

La Fig III.12 représente les CVs (quatre premiers cycles) obtenus pour l'électrode d'or avant et après chaque modification. Comme attendu, les pics d'oxydation et de réduction sont bien visibles et de même intensité pour l'électrode nue. La différence de potentiel séparant les deux pics ($\Delta E_p = E_p(\text{ox}) - E_p(\text{red})$) est de 210 mV. La modification de l'électrode nue par la membrane de PVA/PEI provoque une diminution significative de l'intensité des pics d'oxydoréduction. Cette chute montre que la membrane polymérique réduit de manière significative le transfert électronique. Ce phénomène a été également observé par Omidfar *et al* [20]. Une augmentation de l'intensité des pics est observée suite à l'incorporation des AuNPs ($I_p(\text{ox}) = 1,36 \text{ mA}$ et $I_p(\text{red}) = -1,5 \text{ mA}$). Ceci peut être attribué à la forte conductivité des AuNPs, qui peuvent ainsi améliorer le taux de transfert électronique à l'interface [21]. Lorsque la TLN est à son tour immobilisée, une légère diminution de l'intensité des pics est obtenue ($I_p(\text{ox}) = 1 \text{ mA}$ et $I_p(\text{red}) = -1,3 \text{ mA}$). Ce résultat était prévisible car l'immobilisation d'une enzyme sur la surface d'une électrode limite généralement le transfert des espèces électroactives [22].

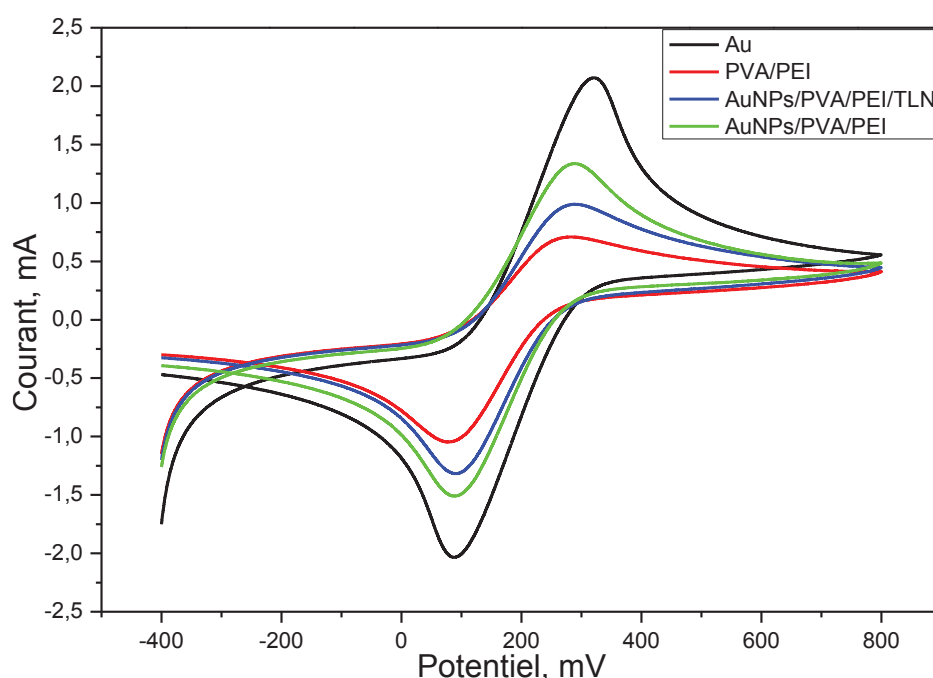


Figure III.12. Voltammogrammes cycliques d'un mélange équimolaire de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ 5mM dans du tampon PBS 10 mM, pH 7 pour les électrodes d'or nue et modifiées. Vitesse de balayage : 100 mV/s.

III.2.2.3. Optimisation de la concentration en AuNPs

Dans cette partie, nous avons fait varier la concentration en AuNPs dans la biomembrane et étudié son influence sur la réponse des électrodes par EIS. Afin d'optimiser les mesures impédimétriques, il est recommandé de fixer la valeur de la tension de polarisation imposée au système afin d'obtenir la plus faible valeur d'impédance possible et de minimiser le phénomène de diffusion.

Pour cela, des mesures d'impédance électrochimique ont été réalisées dans le tampon PBS 10 mM, pH 7, en absence du couple redox, dans une gamme de fréquences comprises entre 100 kHz et 100 mHz à différentes tensions de polarisation allant de $-0,4$ V à $+0,1$ V. La Fig III.13 montre les diagrammes de Nyquist obtenus pour l'électrode modifiée à différents potentiels imposés. Le spectre d'impédance obtenu à $-0,3$ V présente la meilleure forme (demi-cercle de faible diamètre). Il est alors possible avec ce potentiel de distinguer plus clairement les variations d'impédance au niveau de l'interface.

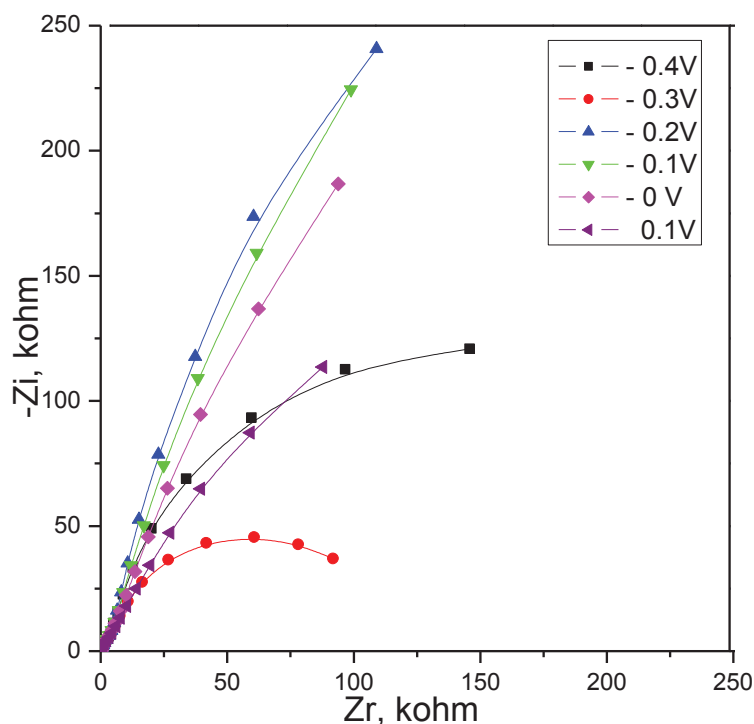


Figure III.13. Spectres d'impédance dans le plan de Nyquist à différentes tensions de polarisation.

Les mesures sont faites dans un tampon PBS 10 mM, pH 7, en absence du couple redox et dans une gamme de fréquences comprises entre 100 kHz et 100 mHz

C'est donc ce potentiel de polarisation ($-0,3$ V) que nous avons choisi pour optimiser la concentration des AuNPs. La Fig III.14 montre les spectres d'impédance pour des électrodes d'or nue et modifiées à l'aide de biomembranes contenant différentes quantités de AuNPs.

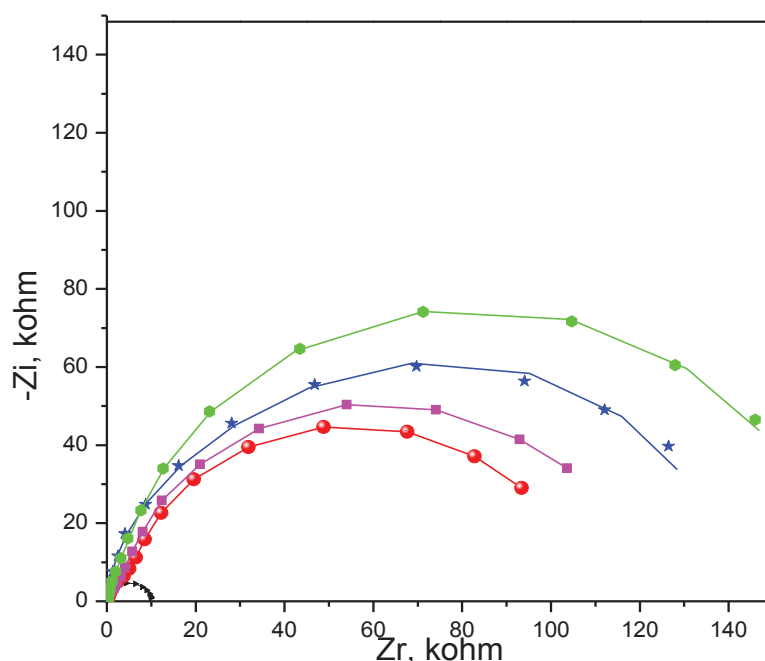


Figure III.14. Diagrammes de Nyquist obtenus pour les mesures d'impédance sur les électrodes nue (►) et modifiée par une biomembrane contenant 10^9 (♦), 10^8 (■), 10^7 (★), 10^6 (●) NPs.

Les symboles représentent les données expérimentales et les courbes pleines représentent les données ajustées en utilisant le circuit équivalent présenté dans la Fig II.12.

Afin d'extraire un maximum d'informations sur les processus se déroulant à l'interface électrode/électrolyte et le comportement électrique de ce système, les spectres d'impédance obtenus pour les différentes quantités de AuNPs ont été modélisés.

Modélisation des spectres d'impédance

Dans notre cas, le spectre de Nyquist obtenu pour l'électrode nue montre un demi-cercle parfait. Il peut être modélisé par un circuit électrique équivalent simple de type Randles dans lequel le terme de diffusion (impédance de Warburg) est nul. Par ailleurs, ce modèle simple ne permet pas de rendre compte du diagramme de Nyquist tracé pour les différentes électrodes modifiées. Le modèle de Randles qui inclut l'impédance de Warburg, Z_w , apparaît dans ce cas plus adapté (Section II.5.2).

La modélisation du spectre de l'électrode d'or nue conduit à une valeur de R_p de 9,49 k Ω ($\chi^2 \sim 10^{-3}$). La CPE est d'environ 10,58 μF (rad/s) $^{1-n}$. La valeur de n est proche de 1 (0,95), suggérant un comportement purement capacitif. La valeur de R_p augmente considérablement (10 fois) par ajout de la membrane polymère à base de PVA/PEI. Ce résultat est attendu puisque l'immobilisation d'une matrice de polymères à caractère résistant (PVA/PEI) bloque le transfert des électrons et par conséquent augmente la résistance de polarisation. Ces données sont en parfait accord avec celles obtenues précédemment par voltammétrie cyclique.

Le même constat a été fait lors de la modification d'une électrode sérigraphiée par une matrice de PVA contenant de la tyrosinase [23].

Une diminution de la résistance de polarisation a été observée au fur et à mesure que la quantité en AuNPs augmente. En effet, la R_p est de 168 k Ω pour 10^6 NPs alors qu'elle est de 106 k Ω pour 10^9 NPs, montrant ainsi le rôle des AuNPs dans l'amélioration du transfert d'électrons. Cette constatation a également été faite par Wang *et al* : le dépôt des AuNPs sur la surface de l'électrode diminue la résistance de transfert de charge et contribue par la suite à l'amélioration de la sensibilité de l'immuno-capteur pour la détection de *Escherichia coli* [24].

La plus faible résistance ayant été obtenue pour la membrane contenant 10^9 NPs, c'est cette valeur que nous avons retenu pour le développement ultérieur du biocapteur conductimétrique.

III.2.2.4. Influence de la concentration en OTA sur les propriétés électrochimiques de la biomembrane PVA/PEI/TLN/AuNPs

La biomembrane à base de PVA/PEI/TLN/AuNPs a ensuite été testée pour son aptitude à détecter l'OTA. Pour cela, la variation de R_p avant et après injection de différentes concentrations en OTA a été mesurée. La Fig III.15 représente les diagrammes de Nyquist dans la gamme de concentrations de 10^{-12} M à 10^{-5} M d'OTA.

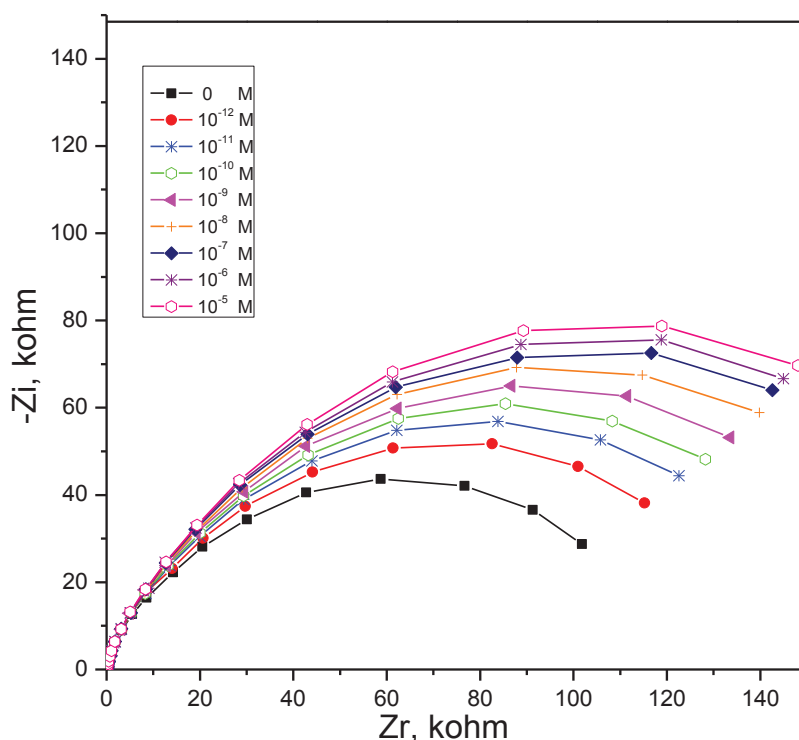


Figure III.15. Diagrammes d'impédance de l'électrode PVA/PEI/TLN/AuNPs avant et après ajout de différentes concentrations en OTA.

Les mesures sont faites dans un tampon PBS 10 mM, pH 7, en absence du couple redox et dans une gamme de fréquences comprises entre 100 mHz et 100 kHz

Les paramètres issus de la modélisation sont présentés dans le tableau III.4.

Tableau III.4. Valeurs des éléments du circuit équivalent obtenues par modélisation des diagrammes de Nyquist présentés sur la Fig III.15.

[OTA]/M	Rs/k Ω	CPE/ μ F(rad/s) ¹⁻ⁿ	n	Rp/k Ω	χ^2 (10 ⁻³)
0	1,183	4,36	0,74	133	4,3
10 ⁻¹²	1,289	4,31	0,74	161	3
10 ⁻¹¹	1,425	4,36	0,74	180	1,2
10 ⁻¹⁰	1,364	4,39	0,73	194	0,5
10 ⁻⁹	1,469	4,38	0,74	207	1,9
10 ⁻⁸	1,121	4,36	0,74	222	0,8
10 ⁻⁷	1,491	4,42	0,73	240	1,3
10 ⁻⁶	1,534	4,47	0,73	255	3,8
10 ⁻⁵	1,554	4,38	0,73	260	1,3

On constate que la valeur de R_p augmente avec la concentration en OTA, ce qui peut être expliqué par l'adsorption progressive des produits chargés de la réaction enzymatique à la surface de l'électrode modifiée. Ce phénomène a déjà été rapporté dans la littérature, par exemple au cours de l'oxydation du glucose par la glucose oxydase [25] ou lors de la méthylation de la norépinéphrine par la phényléthanolamine *N*-méthyl transférase [26].

Afin de confirmer que l'augmentation observée de R_p est due à l'adsorption des produits de la réaction enzymatique, des expériences supplémentaires ont été effectuées en déterminant les valeurs de R_p avant et après injection de 10⁻¹² M d'OTA, ceci avant et après nettoyage de la surface de l'électrode trois fois avec du PBS 10 mM, pH 7. Les résultats sont présentés dans la Fig III.16.

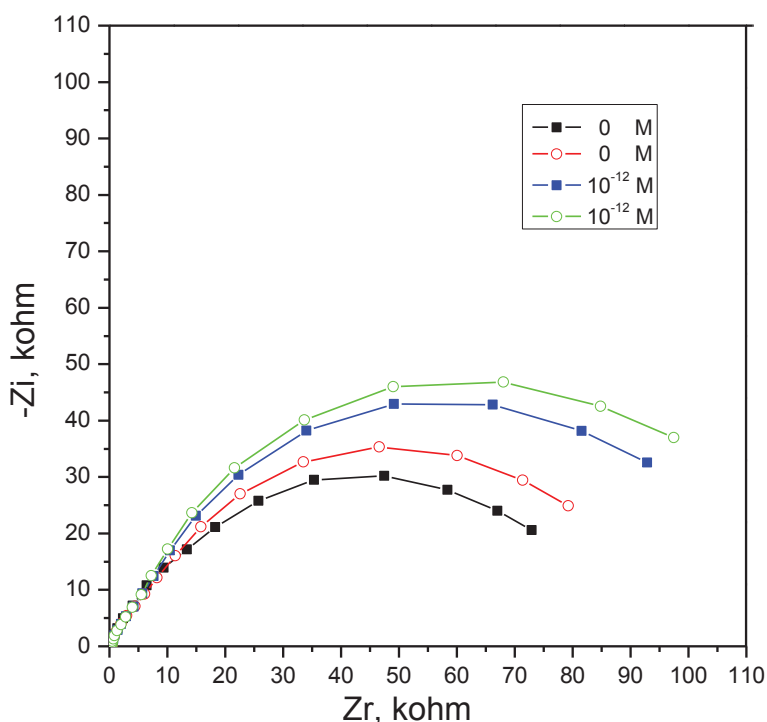


Figure III.16. Diagrammes d'impédance avant et après ajout de 10^{-12} M de l'OTA.

Les symboles pleins correspondent aux courbes Nyquist avant lavage de l'électrode et les symboles vides correspondent à la deuxième série de mesure effectuée après lavage. Les mesures sont faites dans un tampon PBS 10 mM, pH 7, en absence du couple redox et dans une gamme de fréquences comprises entre 100 mHz et 100 kHz.

On constate que la valeur de R_p avant le premier ajout d'OTA est de 89,3 k Ω et passe à 117,6 k Ω après injection de 10^{-12} M d'OTA, ce qui correspond à une variation de 28,3 k Ω . Après rinçage, R_p revient à une valeur de 97,3 k Ω . Cette diminution est due au détachement des produits de la réaction enzymatique de la surface de l'électrode. Une nouvelle injection d'OTA à la même concentration provoque l'augmentation de R_p jusqu'à 124,9 k Ω , ce qui correspond à une variation de R_p proche de la précédente (27,6 k Ω). A partir de ces résultats, on peut conclure que l'adsorption physique des produits de l'hydrolyse de l'OTA à la surface de l'électrode est la cause principale de l'augmentation de R_p . Cette accumulation au voisinage de l'électrode est un atout car on peut espérer qu'elle conduise à une amélioration de la détection lorsque la biomembrane PVA/PEI/TLN/AuNPs sera déposée à la surface des électrodes interdigitées utilisées pour la détection conductimétrique de l'OTA au cours de laquelle le contenu de la cellule électrochimique en tampon phosphate sera renouvelé à chaque mesure. La faible différence de R_p avant et après rinçage sans ajout de substrat peut être attribuée à la persistance après nettoyage d'une faible quantité de produits à la surface de l'électrode.

La variation de résistance relative $\Delta R_p/R_{p0} = (R_p - R_{p0})/R_{p0}$, (où R_p correspond à la valeur de résistance de polarisation après chaque ajout d'OTA et R_{p0} est la valeur de la

résistance avant ajout) est portée en fonction du log de la concentration en OTA sur la Fig III.17.

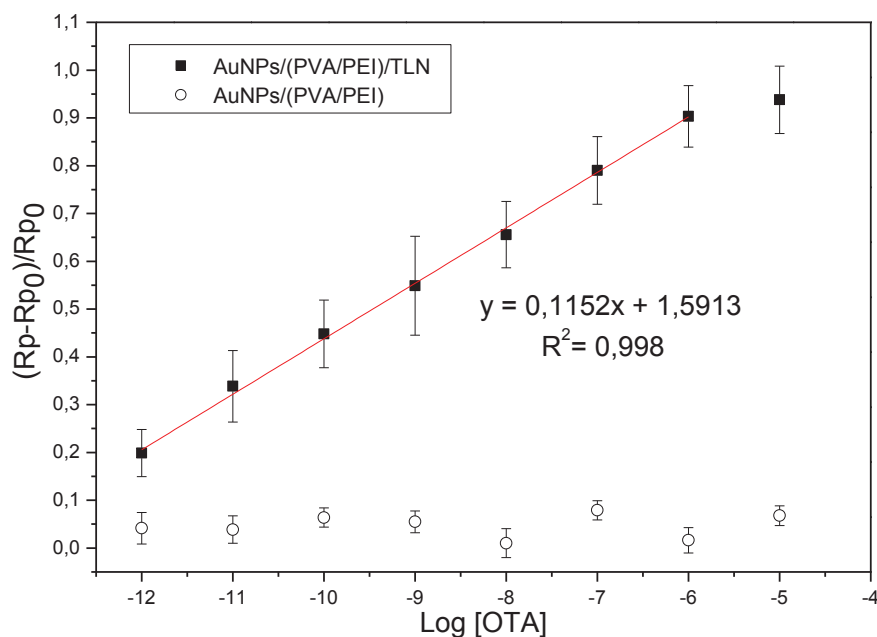


Figure III.17. Variation relative de $\Delta R_p / R_{p0}$ en fonction de la valeur logarithmique de la concentration en OTA en présence et en absence de TLN ($n=3$).

On constate que la variation relative de résistance est proportionnelle à la concentration en OTA dans le domaine 10^{-12} - 10^{-6} M. Si ce type d'électrode modifiée était lui-même utilisé comme biocapteur (ce qui n'est pas envisageable pour l'analyse d'échantillons réels compte-tenu des phénomènes d'adsorption constatés), la limite de détection serait de 0,2 pM.

Un contrôle, réalisé en absence de TLN, montre l'absence d'augmentation significative de R_p en présence d'OTA, dans le même domaine de concentrations. Ceci confirme que la variation de signal observée correspond bien à la détection de l'OTA et non à une adsorption non spécifique.

III.2.2.5. Performances du biocapteur conductimétrique à base de TLN/(PVA/PEI)/AuNPs pour l'analyse de l'OTA

Le nouveau mode d'immobilisation de la TLN évalué semblant prometteur, nous avons ensuite cherché à savoir s'il permettait d'atteindre l'objectif fixé, à savoir conduire à l'amélioration des limites de détection de notre biocapteur conductimétrique. La biomembrane PVA/PEI/TLN/AuNPs a donc été constituée à la surface des électrodes interdigitées utilisées dans la première partie de ce chapitre

III.2.2.5.1. Confirmation des conditions de fabrication et de mesure du biocapteur

Nous avons tout d'abord voulu savoir si le temps de réticulation, le pH et la température déterminés précédemment pour un fonctionnement optimal du biocapteur à base de TLN/BSA

étaient également applicables aux biocapteurs utilisant le mélange hybride de polymères et les nanoparticules d'or.

Temps de réticulation

Ainsi que le montre la Fig III.18, la réponse du biocapteur TLN/(PVA/PEI)/AuNPs à l'injection de 8 nM d'OTA augmente avec le temps de réticulation jusqu'à 35 min puis diminue au-delà de cette valeur. Ces essais réalisés sur trois capteurs différents montrent la capacité du nouveau biocapteur à détecter des concentrations plus faibles en OTA de l'ordre de quelques nM. La sensibilité est donc été améliorée par rapport au biocapteur TLN/BSA.

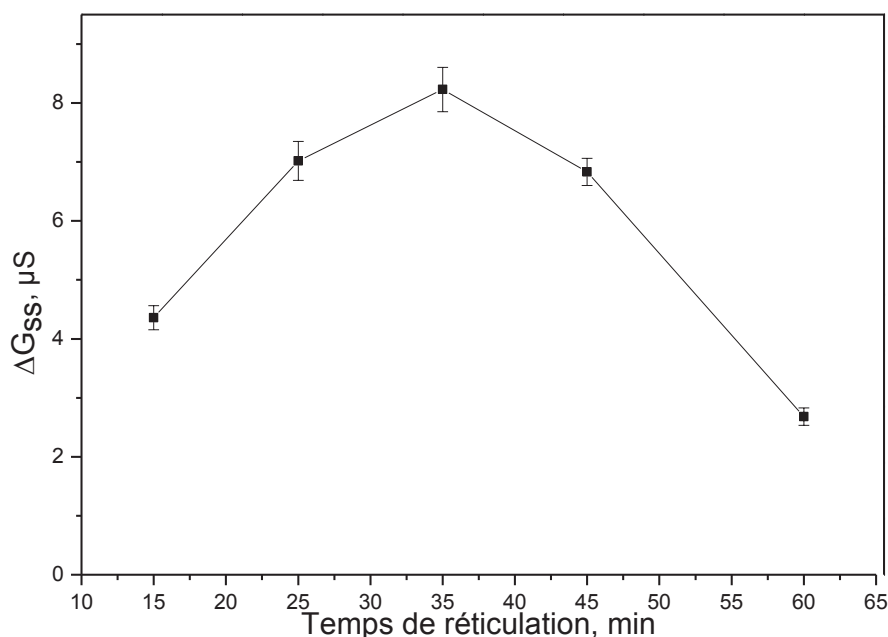


Figure III.18. Effet du temps d'exposition au GA sur la réponse du biocapteur TLN/AuNPs/(PVA/PEI) après l'injection de 8 nM OTA.

Tampon phosphate 5 mM pH 7.0 ; température 25 ± 2 °C ; n=3

La réponse du biocapteur a également été mesurée après injection de concentrations croissantes en OTA, à deux temps d'exposition au GA, à savoir 25 min et 35 min (Fig III.19). Cette réponse est linéaire pour le temps de réaction le plus élevé, ce qui n'est pas le cas pour 25 min de réticulation. L'amélioration de l'intensité du signal et de la linéarité de la réponse avec le temps de réaction est cohérente avec la rigidification de la structure de l'enzyme et la contraction du réseau induites par l'augmentation du taux de réticulation.

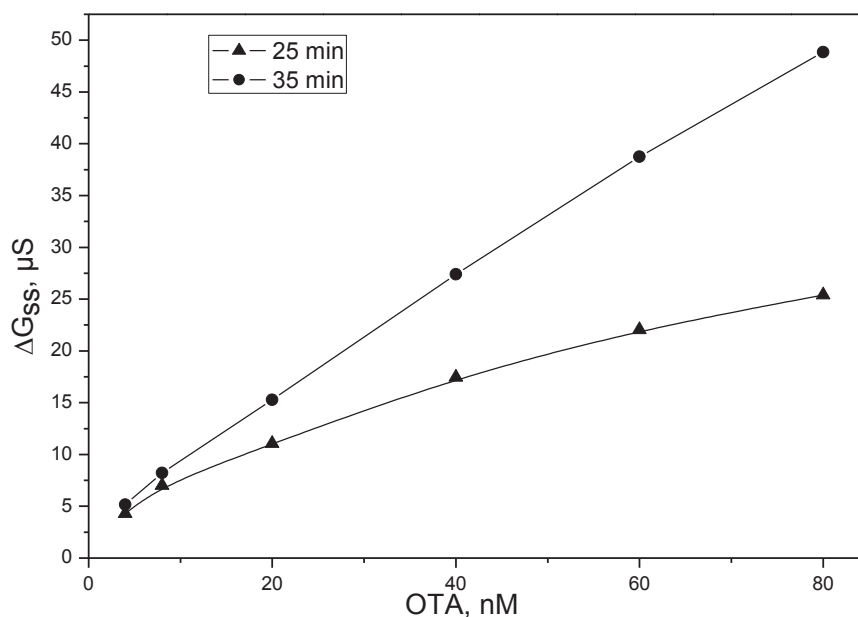


Figure III.19. Réponse du biocapteur TLN/AuNPs/(PVA/PEI) pour différentes concentrations d'OTA et des temps de réticulation de 25 et 35 min.

Tampon phosphate 5 mM pH 7.0 ; température 25 ± 2 °C ; n=3.

La Fig III.20 met par ailleurs en évidence une plus grande influence du temps de réticulation sur la réponse du biocapteur TLN/BSA que sur celle du biocapteur TLN/(PVA/PEI)/AuNPs. Ainsi par exemple, 15% seulement du signal de ce dernier est perdu quand le temps de réticulation passe de 35 à 25 min alors qu'il baisse de 60% pour le biocapteur TLN/BSA. Ceci peut être attribué à une meilleure stabilité de l'enzyme dans la matrice polymérique grâce à la formation de liaisons hydrogènes et de liaisons ioniques avec les groupements amines et hydroxyles du PEI et du PVA, créant ainsi un environnement plus favorable à l'activité catalytique de l'enzyme.

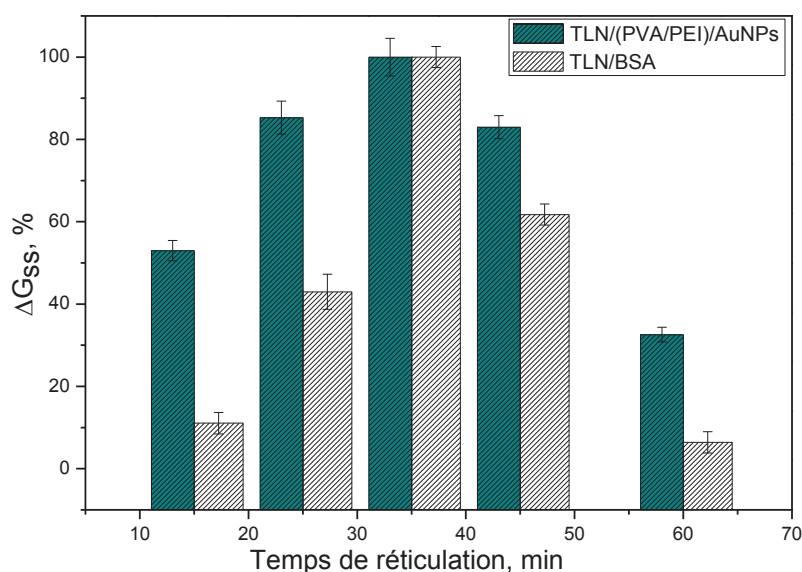


Figure III.20. Comparaison de l'effet du temps de réticulation sur la réponse des biocapteurs. Biocapteur TLN/AuNPs/(PVA/PEI) : [OTA]= 8 nM, biocapteur BSA/TLN: [OTA]= 10 μM. Les variations de conductance ont été calculées par rapport à un maximum qui a été fixé à 100% .

pH

Pour déterminer le pH optimal de fonctionnement du biocapteur TLN/AuNPs/(PVA/PEI), quatre électrodes ont été préparées et les mesures ont été effectuées à différentes valeurs de pH, allant de 5 à 9, pour une concentration de 4 nM d'OTA. Les résultats sont présentés dans la Fig III.21. On constate que, l'intensité du biocapteur augmente jusqu'à un pH de 6, reste relativement stable dans la gamme 6-7, puis diminue fortement à des pH basiques. Ce résultat est en accord avec ce qui a été rapporté pour l'hydrolyse catalysée par la TLN de certains oligopeptides tels que le *N*-furylacryloylglycyl-L-leucinamide [27] ou le peptide Z-Gly- Leu-Ala [3]. La gamme optimale de pH est légèrement plus large (6-8) pour le biocapteur TLN/BSA (Fig III.2).

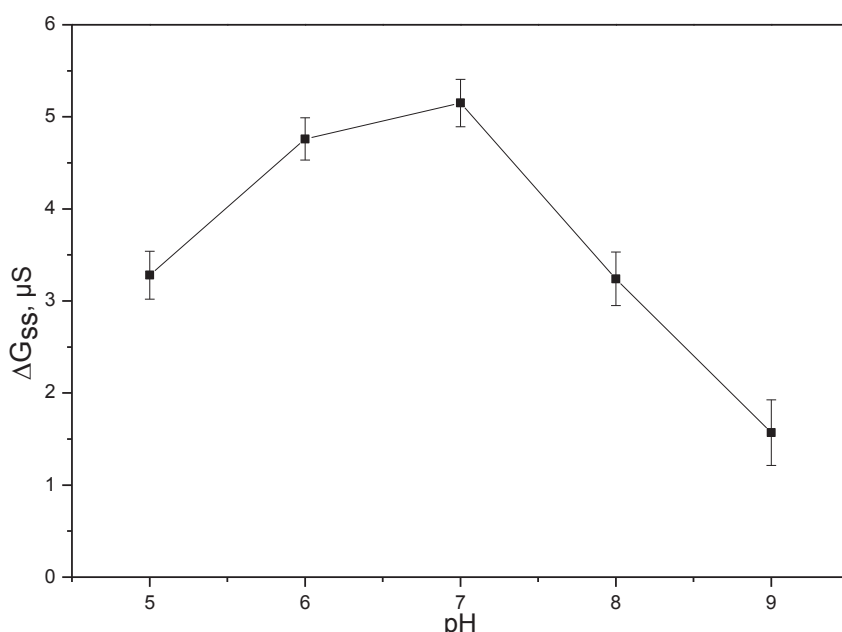


Figure III.21. Influence du pH du milieu sur le fonctionnement du biocapteur TLN/AuNPs/(PVA/PEI).

[OTA]= 4 nM ; Tampon phosphate 5 mM; température 25 ± 2 °C ; n = 4.

Température

De même, nous avons étudié l'influence de la température sur la réponse du biocapteur TLN/AuNPs/(PVA /PEI) dans la gamme de 10 – 50 °C. Comme on le voit sur la Fig III.22, le signal est maximal dans le domaine allant de 20 à 40 °C. Ce domaine optimal est similaire à celui obtenu pour le biocapteur TLN/BSA (Fig III.3).

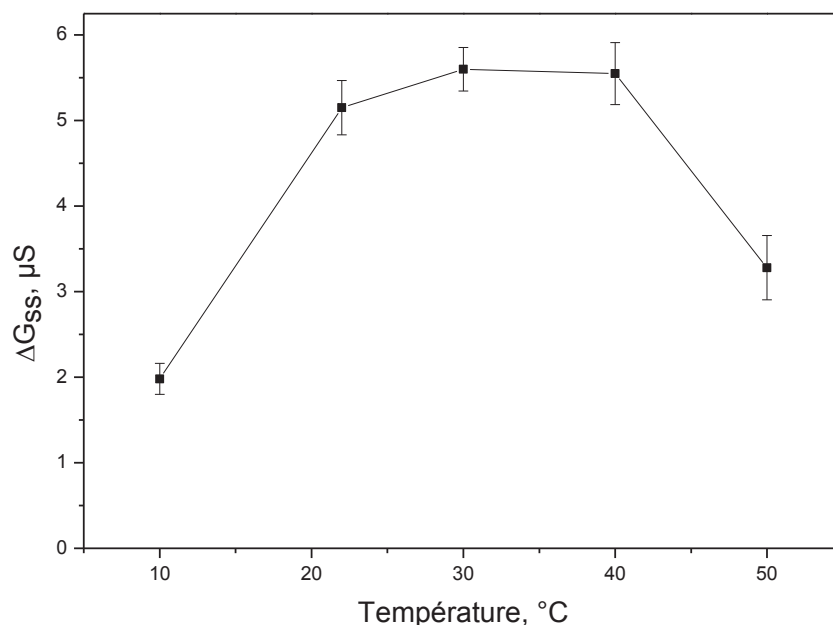


Figure III 22. Influence de la température sur le fonctionnement du biocapteur TLN/AuNPs/(PVA/PEI).

[OTA]= 4 nM; Tampon phosphate 5 mM ; pH 7 ; n=3.

Compte tenu de l'ensemble de ces résultats, il est possible de conclure que la modification du mode d'immobilisation de la TLN ne change pas de manière significative les conditions optimales de fonctionnement du biocapteur. Pour cela, les biocapteurs seront réticulés pendant 35 min et les mesures réalisées à pH 7 et à 25 °C.

III.2.2.5.2. Caractéristiques analytiques du biocapteur TLN/ (PVA/PEI)/AuNPs

Linéarité et sensibilité

La linéarité et la sensibilité du biocapteur ont été évaluées puis comparées aux performances du biocapteur TLN / BSA. Pour ce faire, dix solutions étalons ont été utilisées et trois mesures ont été effectuées pour chaque niveau de concentration. La variation de conductance a été mesurée dans une gamme de concentration en OTA allant de 2 à 200 nM (Fig III.23). La réponse du biocapteur est linéaire jusqu'à 60 nM. Le coefficient de détermination et la sensibilité sont respectivement 0,9994 et $0,597 \pm 0,005 \mu S.nM^{-1}$. La limite de détection obtenue est de 1 nM, 700 fois mieux que pour le biocapteur à base de BSA (0,7 μM), confirmant l'intérêt de l'immobilisation de la TLN par le film hybride à base de AuNPs et de (PVA / PEI).

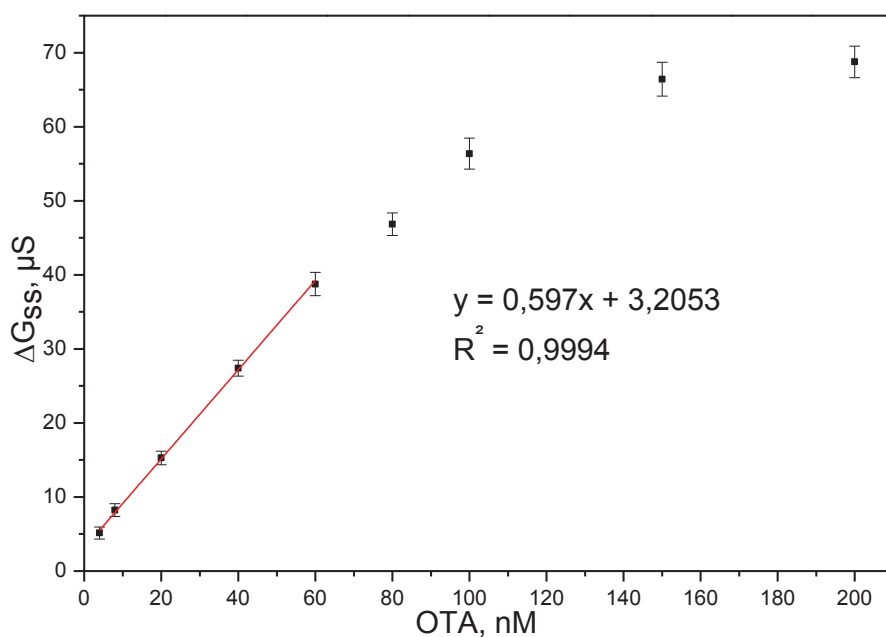


Figure III.23. Evolution de la réponse de biocapteur TLN / AuNPs / (PVA / PEI) en fonction de la concentration en OTA dans les conditions optimales (n = 3).

Afin de mieux évaluer la contribution des AuNPs et de la matrice polymérique (PEI/PVA) dans l'amélioration de sensibilité du biocapteur, deux autres séries de biocapteurs (AuNPs/BSA/TLN et (PVA/PEI)/TLN) ont été préparées comme décrit dans la section II.3 et ensuite testées pour des concentrations en OTA de 0,5, 1 et 2 μM . Les résultats sont présentés dans la Fig III.24.

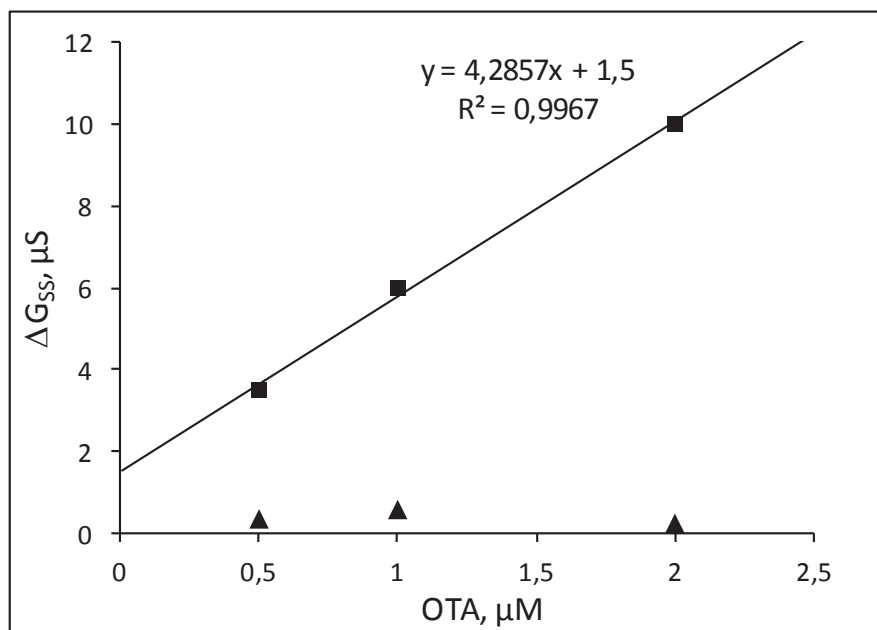


Figure III.24. Comparaison des réponses des biocapteurs TLN / (PVA / PEI) (▲) et TLN / AuNPs / BSA (■).

Aucune réponse significative n'a été observée pour le biocapteur (PVA/PEI)/TLN, ce qui est cohérent avec les propriétés isolantes du film hydrogel (PEI/PVA) réticulé à la surface de l'électrode. Le signal mesuré provient de l'activité des enzymes situées au voisinage immédiat de l'électrode, à quelques dizaines ou centaines de nanomètres. La quantité d'enzymes présentes dans cette zone étant faible par rapport à la quantité totale déposée, le signal produit est difficilement détectable. L'ajout de AuNPs conduit à une amélioration significative de la sensibilité du biocapteur, une sensibilité de $4,286 \mu\text{S} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ étant obtenue pour le biocapteur TLN/AuNPs / BSA au lieu de $0,8059 \mu\text{S} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ pour le biocapteur TLN/BSA. Ce résultat est en accord avec des résultats antérieurs [28] et confirme bien l'effet positif des nanomatériaux conducteurs sur l'amélioration du signal. Le remplacement de la BSA par la matrice polymérique (PVA/PEI) induit une augmentation de la sensibilité ($4,286 \mu\text{S} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ au lieu de $597 \mu\text{S} \cdot \mu\text{M}^{-1}$). Il est probable que la diffusion de l'OTA à travers le réseau TLN/BSA est entravée en raison de la formation d'agrégats réticulés, tandis que l'accès direct à l'enzyme est facilité dans le film d'hydrogel (PVA/PEI) dont la teneur en eau et la porosité sont élevées.

De plus, les AuNPs offrent une conductivité élevée et une grande surface d'échange d'électrons en raison de leur faible diamètre. Les nanomatériaux conducteurs, lorsqu'ils sont incorporés dans l'hydrogel, peuvent agir comme des nanoélectrodes implantées qui raccourcissent les distances de transfert de charges et favorisent les relais électriques entre le site actif de l'enzyme et l'électrode [29]. La formation de composites enzymes/NPs/hydrogels assure une meilleure dispersion des nanoparticules et favorise la stabilisation de l'enzyme et son accessibilité au substrat. Les biomembranes formées possèdent des propriétés de transfert électronique et de transport de masse améliorées [30] et sont particulièrement adaptées à l'élaboration de biocapteurs électrochimiques [31].

Temps de réponse et paramètres cinétiques

Le temps de réponse a été également déterminé. Comme on le voit sur la Fig III.25, le biocapteur TLN/AuNPs/(PVA/ PEI) possède des temps de réponse plus élevés que ceux du biocapteur TLN/BSA présentés sur la Fig II.7. Ceux-ci varient de 7 à 48 min, pour une gamme de concentrations en OTA allant de 4 à 200 nM, alors qu'ils ne dépassent pas 25 min pour $150 \mu\text{M}$ d'OTA avec le biocapteur TLN/BSA. Cette augmentation du temps de réponse peut être liée à la diffusion lente du substrat à travers les pores de la membrane polymérique ou encore à une partition électrostatique de l'OTA (chargée partiellement négativement) dans le support comportant des charges positives attractives provenant du PEI et des charges négatives présentes à la surface des AuNPs.

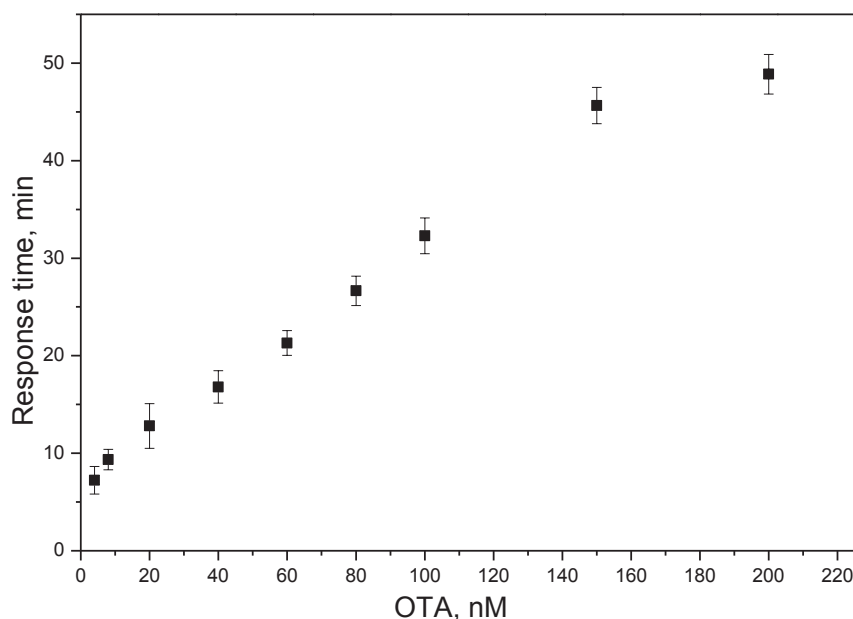


Figure III.25. Evolution du temps de réponse du biocapteur TLN / AuNPs / (PVA / PEI) en fonction de la concentration en OTA ($n = 3$).

L'influence du mode d'immobilisation sur la cinétique d'hydrolyse de l'OTA a été également examinée. La Fig III.26 représente V_i vs [OTA]. L'allure de la courbe n'est manifestement pas hyperbolique, indiquant une cinétique non michaelienne, contrairement à ce qui a été obtenu pour le biocapteur TLN/BSA. Un coefficient de détermination faible ($R^2 = 0,9574$) a été obtenu en essayant d'ajuster les données de la courbe $1/V_i$ vs $1/[OTA]$ à un modèle de régression linéaire. Ce résultat peut s'expliquer, comme l'augmentation du temps de réponse, par le fait que la vitesse globale mesurée dépend non seulement de la cinétique enzymatique mais également de la vitesse de transfert de l'OTA depuis le macro-environnement vers le micro-environnement de l'électrode, et que cette étape devient limitante en présence de la matrice polymérique. Il serait approprié, dans ce cas, d'utiliser un modèle plus complexe prenant en compte, non seulement une cinétique enzymatique de type Michaelis-Menten, mais également la diffusion du substrat à travers la matrice d'immobilisation et d'éventuelles interactions électroactives entre l'OTA et les composants de cette matrice [32].

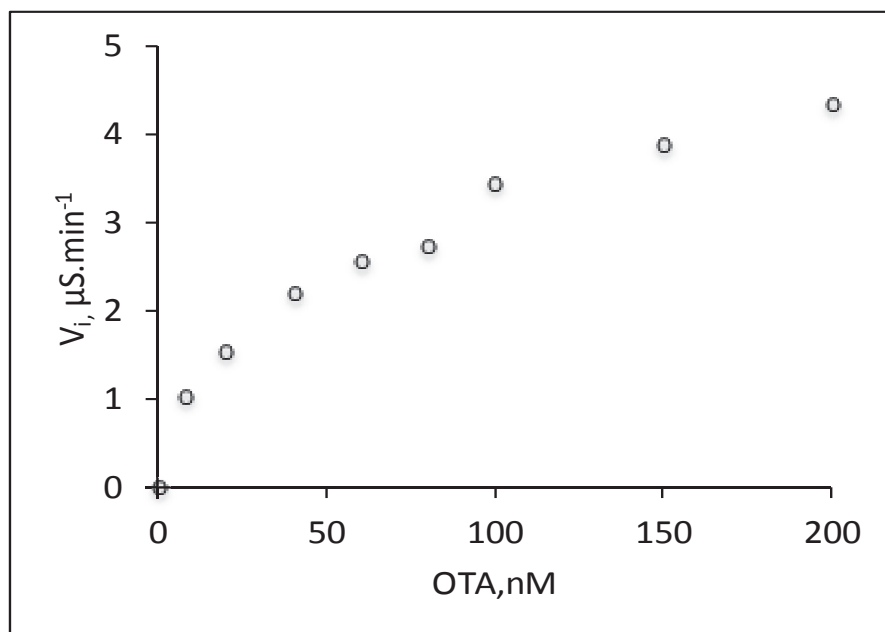


Figure III.26. Evolution de la vitesse initiale V_i en fonction de la concentration en OTA pour le biocapteur TLN / AuNPs / (PVA / PEI).

Reproductibilité intra- et inter- biocapteurs à court terme

Les coefficients de variation obtenus à partir de trois mesures effectuées à chaque concentration d'OTA avec le même capteur TLN/(PVA/PEI)/AuNPs se situent entre 2% et 6% dans la gamme de concentration étudiée (2-200 nM). La reproductibilité inter-capteurs, évaluée à partir de trois électrodes, est également satisfaisante, puisque les coefficients de variation varient de 3 à 15% dans cette même gamme.

Stabilité de stockage

Une étude de stabilité réalisée sur le biocapteur TLN/(PVA/PEI)/AuNPs montre que celui-ci garde 90% de sa réponse après 30 jours de stockage à 4° C dans le tampon phosphate 20 mM pH7. Ce résultat est similaire à celui obtenu avec le biocapteur TLN/BSA, montrant que la matrice polymérique et la BSA ont un effet protecteur et stabilisateur sur la TLN.

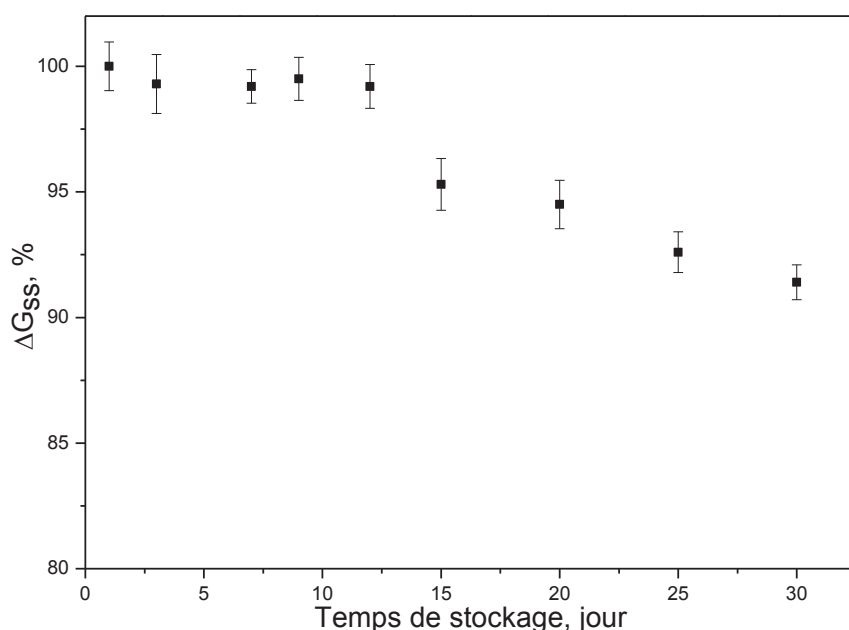


Figure III.27. Etude de la stabilité à long terme du biocapteur TLN/(PVA/PEI)/AuNPs.

Stockage à 4°C dans du tampon phosphate 20 mM pH 7 entre deux mesures (n=3).

III.2.2.5.3. Application à des échantillons réels d'huile d'olive

Le biocapteur TLN/AuNPs/(PVA/PEI) a été ensuite évalué pour la quantification de l'OTA dans des échantillons réels. A cet effet, un échantillon commercial d'huile d'olive a été enrichi avec 1,25, 5 ou 10 μM OTA, et 20 μL de l'échantillon brut ainsi que de chacun des échantillons enrichis ont été injectés dans la cellule conductimétrique (5mL). Les mesures ont été effectuées le même jour et la concentration totale en OTA est directement déduite de la réponse du biocapteur en utilisant la courbe d'étalonnage établie à partir de solutions étalons préparées dans le tampon phosphate. Aucun prétraitement de l'échantillon n'a été effectué. Aucun signal n'a été observé pour l'échantillon brut, montrant que si l'OTA est présente dans l'huile, sa concentration est inférieure à 0,25 μM . De même, l'analyse des échantillons enrichis conduit à des taux de recouvrement proches de 100% (Tab III.5). De ce fait, on peut conclure que le dispositif conçu est approprié pour l'analyse de l'huile d'olive en particulier et de toutes les autres huiles végétales en général.

Tableau III.5. Analyse des échantillons d'huile d'olive dopés

Concentration ajoutée (μM)	Concentration détectée (μM)	Taux de recouvrement (%) \pm S.D
1,25	1,20	96 \pm 3
5,00	4,90	98 \pm 4
10,0	10,10	101 \pm 3

III.2.2.5.4. Comparaison des performances analytiques du biocapteur avec d'autres biocapteurs électrochimiques conçus pour la détection de l'OTA.

Un grand nombre de biocapteurs électrochimiques a été élaboré pour la détection de l'OTA. Le tableau présenté ci-dessous rassemble quelques exemples (Tab III.6). La plupart d'entre eux se base sur l'affinité de la molécule pour des anticorps ou des aptamères spécifiques. Les biocapteurs à base d'aptamères s'avèrent les plus sensibles. Cependant, leur élaboration est généralement basée sur des architectures sophistiquées qui nécessitent l'utilisation de composants coûteux. De ce fait, leur production à grande échelle et à faible coût ainsi que leur utilisation répétée ne peuvent pas être raisonnablement envisagées. Les immunocapteurs, ont été aussi énormément exploités pour la détection de l'OTA. Ils offrent une sensibilité élevée mais l'inconvénient majeur à leur utilisation réside dans leur mode de production (très long et nécessitant l'utilisation d'animaux). Bien qu'il soit moins sensible, notre biocapteur enzymatique offre les avantages d'être plus simple, robuste, moins coûteux et facilement régénérable en milieu aqueux. Il offre une limite de détection de 1 nM, proche ou nettement meilleure que celles obtenues pour les deux seuls biocapteurs enzymatiques développés jusqu'à présent (27 nM [11] et 0,25 nM [10]).

Tableau III.6. Comparaison des performances analytiques du biocapteur proposé avec d'autres biocapteurs électrochimiques récemment rapportés dans la littérature.

Biorécepteur	Méthode de détection	Domaine de linéarité (nM)	Limite de détection (nM)	Nanomatériaux	Echantillon	Référence
Enzymes	CA	24-203	27	-	bière	[11]
	CA	0,25-2	0,25	-	bière et café	[10]
Anticorps	Conductimétrie	2-100	1	Au NPs	huile d'olive	Ce travail
	EIS	Jusqu'à 24	2,4	-	-	[33]
		2,47-50	1,2	-	-	[34]
		0,024-12	0,024	Mg NPs	vin blanc	[35]
Aptamères	CA	Up to 148	30	-	-	[36]
	DPV	2,5-2500	0,5	Au NPs	maïs	[37]
	SWV	0,024-50	0,020	Mg NPs	vin rouge	[38]
	CA	0,024-0,050	0,001	-	blé	[39]
	DPV	0,001-50	0,0003	Au NPs	vin rouge	[40]
		0,0025-2,5	0,00075	Au NPs	vin rouge	[41]
	SWV	0,00024-2,4	0,0002	-	vin rouge	[42]
	CV	0,24-50	0,07	Au NPs	vin rouge	[43]
	EIS	0,1-100	0,02	Au NPs	bière	[44]
	EIS	0,001-123	0,00074	Au NPs/GO	vin rouge	[45]
	EIS	0,37-6,16	0,37	-	cacao	[46]
	EIS	0,01-100	0,014	IrO ₂ NPs	vin blanc	[47]

EIS	0,25-500	0,07	Au NPs	-	[48]
-----	----------	------	--------	---	------

CA : chronoampérométrie ; EIS : spectroscopie d'impédance électrochimique ; DPV : voltammétrie d'impulsion différentielle ; SWV : voltammétrie à onde carrée ; CV : voltammétrie cyclique ; GO : oxyde de graph

III.2.3. Conclusion

Un biocapteur original a été conçu pour la détection de l'OTA dans des échantillons d'huile d'olive. La TLN a tout d'abord été choisie comme élément de biorecognition. L'immobilisation de la TLN dans une matrice de polymère (PVA/ PEI) contenant des AuNPs a permis d'améliorer nettement les performances du biocapteur par rapport à celles obtenues en utilisant un mode d'immobilisation plus classique basé sur une réticulation de l'enzyme en présence de BSA. Dans les conditions optimales (temps de réticulation de 35 min, un pH de 7 et une température de 25 ° C), la réponse du biocapteur est linéaire jusqu'à 60 nM OTA, avec une sensibilité de $597 \mu\text{S} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ et une limite de détection de 1 nM, soit 700 fois plus faible que la limite de détection obtenue en utilisant le procédé plus classique basé sur la réticulation de l'enzyme en présence de la BSA. La matrice polymérique (PVA/PEI) utilisée crée un environnement aqueux très favorable pour l'enzyme. En outre, les interactions entre les groupements amines protonés de PEI et les charges négatives à la fois de la thermolysine et des AuNPs citratées contribuent à l'amélioration de la dispersion de ces derniers et par conséquent favorise la stabilité de l'enzyme et l'accessibilité du substrat. Aucun signal n'a été observé après l'injection d'OTA en absence des AuNPs. Ce résultat est en accord avec les propriétés isolantes du film hydrogel réticulé (PVA / PEI) à la surface de l'électrode. L'incorporation des AuNPs dans la biomembrane TLN /BSA a amélioré la sensibilité d'un facteur de 5,3 mais reste 140 fois plus faible que celle du biocapteur TLN/ AuNPs/(PVA/ PEI). L'étude des cinétiques enzymatiques a montré que l'allure de V_i vs [OTA] est non-hyperbolique indiquant que le mode michaelien seul n'explique pas les résultats obtenus. Les temps de réponse sont plus longs que ceux obtenus pour le biocapteur TLN/BSA avec une valeur maximale de 48 min atteinte pour environ 200 nM en OTA. Cette différence peut être due au phénomène de diffusion des molécules de substrat à travers les pores de la matrice polymérique et ou au phénomène de partition électrostatique de l'OTA dans le support en présence des AuNPs citratées chargées négativement et de PEI chargé positivement.

Les mesures réalisées avec le biocapteur proposé sont reproductibles avec des coefficients de variation allant de 3 à 15% dans la gamme de concentrations étudiée. Le biocapteur est stable sur une période de 30 jours lorsqu'il est conservé à 4 °C dans du tampon phosphate 20 mM. Ce dispositif a été utilisé avec succès pour la quantification de l'OTA dans des échantillons d'huile d'olive dopées démontrant ainsi la pertinence de la méthode proposée pour l'analyse de l'huile d'olive sans aucun prétraitement de l'échantillon et avec des taux de recouvrement proches de 100%.

L'objectif fixé visant à une amélioration d'un facteur 7000 par rapport au biocapteur TLN/BSA n'a pour le moment pas pu être atteint, mais pourrait peut-être l'être grâce à l'injection d'une quantité plus importante d'échantillon (200 μL ou plus). Il serait néanmoins nécessaire de vérifier que l'injection d'un volume aussi élevé dans le milieu électrolytique ne perturbe pas la mesure qu'elle conduit à des résultats reproductibles et qu'elle n'induit pas d'effet de matrice. L'ajout d'une étape de préconcentration/purification par extraction de l'échantillon reste possible puisque nous en avons démontré la faisabilité, mais des expériences supplémentaires seraient indispensables afin d'améliorer ses performances et de la valider sur des échantillons d'huile de très faibles concentrations.

Références

- [1] L. Abrunhosa, R.R.M. Paterson, A. Venâncio, Biodegradation of ochratoxin A for food and feed decontamination, *Toxins*. 2 (2010) 1078–1099.
- [2] R. Hayashi, Y. Bai, T. Hata, Kinetic Studies of Carboxypeptidase Y I. Kinetic Parameters for the Hydrolysis of Synthetic Substrates, *J. Biochem. (Tokyo)*. 77 (1975) 69–79.
- [3] K. Morihara, H. Tsuzuki, Thermolysin: kinetic study with oligopeptides, *Eur. J. Biochem. FEBS*. 15 (1970) 374–380.
- [4] W.S. Lewis, S.M. Schuster, Carboxypeptidase Y stability, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 20818–20822.
- [5] V.G. Eijssink, O.R. Veltman, W. Aukema, G. Vriend, G. Venema, Structural determinants of the stability of thermolysin-like proteinases, *Nat. Struct. Biol.* 2 (1995) 374–379.
- [6] A. Bittner, B. Cramer, H.-U. Humpf, Matrix binding of ochratoxin A during roasting, *J. Agric. Food Chem.* 61 (2013) 12737–12743.
- [7] L. Abrunhosa, A. Venâncio, Isolation and purification of an enzyme hydrolyzing ochratoxin A from *Aspergillus niger*, *Biotechnol. Lett.* 29 (2007) 1909–1914.
- [8] R.C. Doster, R.O. Sinnhuber, Comparative rates of hydrolysis of ochratoxins A and B in vitro, *Food Cosmet. Toxicol.* 10 (1972) 389–394.
- [9] M.J. Pitout, The hydrolysis of ochratoxin A by some proteolytic enzymes, *Biochem. Pharmacol.* 18 (1969) 485–491.
- [10] M.A. Alonso-Lomillo, O. Domínguez-Renedo, L.D.T. Román, M.J. Arcos-Martínez, Horseradish peroxidase-screen printed biosensors for determination of Ochratoxin A, *Anal. Chim. Acta*. 688 (2011) 49–53.
- [11] M.A. Alonso-Lomillo, O. Domínguez-Renedo, L. Ferreira-Gonçalves, M.J. Arcos-Martínez, Sensitive enzyme-biosensor based on screen-printed electrodes for Ochratoxin A, *Biosens. Bioelectron.* 25 (2010) 1333–1337.
- [12] A. Hayat, A. Sassolas, J.-L. Marty, A.-E. Radi, Highly sensitive ochratoxin A impedimetric aptasensor based on the immobilization of azido-aptamer onto electrografted binary film via click chemistry, *Talanta*. 103 (2013) 14–19.
- [13] G. Wulff, Molecular Imprinting in Cross-Linked Materials with the Aid of Molecular Templates— A Way towards Artificial Antibodies, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 34 (1995) 1812–1832.
- [14] Linqiu Cao, Rolf D. Schmid, Wiley: Carrier-bound Immobilized Enzymes: Principles, Application and Design - Linqiu Cao, Rolf D. Schmid, 2006. <http://eu.wiley.com/WileyCDA/WileyTitle/productCd-3527312323.html> (accessed October 19, 2015).
- [15] G.J.M. Koper, M. Borkovec, Proton binding by linear, branched, and hyperbranched polyelectrolytes, *Polymer*. 51 (2010) 5649–5662.
- [16] M. Tencer, R. Charbonneau, N. Lahoud, P. Berini, AFM study of BSA adlayers on Au stripes, *Appl. Surf. Sci.* 253 (2007) 9209–9214.
- [17] K. Balashev, T.H. Callisen, A. Svendsen, T. Bjørnholm, Savinase action on bovine serum albumin (BSA) monolayers demonstrated with measurements at the air-water interface and liquid Atomic Force Microscopy (AFM) imaging, *Colloids Surf. B Biointerfaces*. 88 (2011) 582–586.
- [18] K. Awsiuk, A. Budkowski, M.M. Marzec, P. Petrou, J. Rysz, A. Bernasik, Effects of polythiophene surface structure on adsorption and conformation of bovine serum albumin: a multivariate and multitechnique study, *Langmuir ACS J. Surf. Colloids*. 30 (2014) 13925–13933.

- [19] L.S. Jasti, S.R. Dola, T. Kumaraguru, S. Bajja, N.W. Fadnavis, U. Addepally, Rajdeo K, Ponrathnam S, Deokar S., Protein-coated polymer as a matrix for enzyme immobilization: immobilization of trypsin on bovine serum albumin-coated allyl glycidyl ether-ethylene glycol dimethacrylate copolymer, *Biotechnol. Prog.* 30 (2014) 317–323.
- [20] K. Omidfar, A. Dehdast, H. Zarei, B.K. Sourkahi, B. Larijani, Development of urinary albumin immunosensor based on colloidal AuNP and PVA, *Biosens. Bioelectron.* 26 (2011) 4177–4183.
- [21] K. Omidfar, H. Zarei, F. Gholizadeh, B. Larijani, A high-sensitivity electrochemical immunosensor based on mobile crystalline material-41-polyvinyl alcohol nanocomposite and colloidal gold nanoparticles, *Anal. Biochem.* 421 (2012) 649–656.
- [22] T. Gu, J. Wang, H. Xia, S. Wang, X. Yu, Direct Electrochemistry and Electrocatalysis of Horseradish Peroxidase Immobilized in a DNA/Chitosan-Fe₃O₄ Magnetic Nanoparticle Bio-Complex Film, *Materials*. 7 (2014) 1069–1083.
- [23] Y. Rodríguez-Carrasco, G. Font, J.C. Moltó, H. Berrada, Quantitative determination of trichothecenes in breadsticks by gas chromatography-triple quadrupole tandem mass spectrometry, *Food Addit. Contam. Part Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* 31 (2014) 1422–1430.
- [24] Y. Wang, J. Ping, Z. Ye, J. Wu, Y. Ying, Impedimetric immunosensor based on gold nanoparticles modified graphene paper for label-free detection of Escherichia coli O157:H7, *Biosens. Bioelectron.* 49 (2013) 492–498.
- [25] T.L. Adamson, F.A. Eusebio, C.B. Cook, J.T. LaBelle, The promise of electrochemical impedance spectroscopy as novel technology for the management of patients with diabetes mellitus, *The Analyst*. 137 (2012) 4179–4187.
- [26] B.A. Haselwood, J.T. La Belle, Development of electrochemical methods to enzymatically detect traumatic brain injury biomarkers, *Biosens. Bioelectron.* 67 (2015) 752–756.
- [27] S. Kunugi, H. Hirohara, N. Ise, pH and Temperature Dependences of Thermolysin Catalysis, *Eur. J. Biochem.* 124 (1982) 157–163.
- [28] W. Noura, A. Maaref, H. Elaissari, F. Vocanson, M. Siadat, N. Jaffrezic-Renault, Enhanced response of a proteinase K-based conductometric biosensor using nanoparticles, *Sensors*. 14 (2014) 13298–13307.
- [29] J. Wang, Electrochemical biosensing based on noble metal nanoparticles, *Microchim. Acta*. 177 (2012) 245–270.
- [30] A. de Poulpiquet, A. Ciaccafava, E. Lojou, New trends in enzyme immobilization at nanostructured interfaces for efficient electrocatalysis in biofuel cells, *Electrochimica Acta*. 126 (2014) 104–114.
- [31] M. Hasanzadeh, N. Shadjou, M. de la Guardia, Electrochemical biosensing using hydrogel nanoparticles, *TrAC Trends Anal. Chem.* 62 (2014) 11–19.
- [32] J.S. Dieter Britz, Digital simulation of chronoamperometry at a disk electrode under a flat polymer film containing an enzyme, *Electrochim Acta*. 152 (2015) 302–307.
- [33] R. Khan, M. Dhayal, Chitosan/polyaniline hybrid conducting biopolymer base impedimetric immunosensor to detect Ochratoxin-A, *Biosens. Bioelectron.* 24 (2009) 1700–1705.
- [34] A.-E. Radi, X. Muñoz-Berbel, V. Lates, J.-L. Marty, Label-free impedimetric immunosensor for sensitive detection of ochratoxin A, *Biosens. Bioelectron.* 24 (2009) 1888–1892.
- [35] L.-G. Zamfir, I. Geana, S. Bourigua, L. Rotariu, C. Bala, A. Errachid, N. Jaffrezic-Renault, Highly sensitive label-free immunosensor for ochratoxin A based on

- functionalized magnetic nanoparticles and EIS/SPR detection, *Sens. Actuators B Chem.* 159 (2011) 178–184.
- [36] A.-E. Radi, X. Muñoz-Berbel, M. Cortina-Puig, J.-L. Marty, An electrochemical immunosensor for ochratoxin A based on immobilization of antibodies on diazonium-functionalized gold electrode, *Electrochimica Acta.* 54 (2009) 2180–2184.
- [37] X. Liu, Z. Yang, Y. Zhang, R. Yu, A novel electrochemical immunosensor for ochratoxin A with hapten immobilization on thionine/gold nanoparticle modified glassy carbon electrode, *Anal. Methods.* 5 (2013) 1481–1486.
- [38] P.R. Perrotta, F.J. Arévalo, N.R. Vettorazzi, M.A. Zón, H. Fernández, Development of a very sensitive electrochemical magneto immunosensor for the direct determination of ochratoxin A in red wine, *Sens. Actuators B Chem.* 162 (2012) 327–333.
- [39] J.C. Jing Zhang, An electrochemical biosensor based on hairpin-DNA aptamer probe and restriction endonuclease for ochratoxin A detection, *Electrochem. Commun.* 25 (2012) 5–7.
- [40] S. Xie, Y. Chai, Y. Yuan, L. Bai, R. Yuan, Development of an electrochemical method for Ochratoxin A detection based on aptamer and loop-mediated isothermal amplification, *Biosens. Bioelectron.* 55 (2014) 324–329.
- [41] X. Yang, J. Qian, L. Jiang, Y. Yan, K. Wang, Q. Liu, Wang K, Ultrasensitive electrochemical aptasensor for ochratoxin A based on two-level cascaded signal amplification strategy, *Bioelectrochemistry Amst. Neth.* 96 (2014) 7–13.
- [42] J. Wu, H. Chu, Z. Mei, Y. Deng, F. Xue, L. Zheng, Chen W., Ultrasensitive one-step rapid detection of ochratoxin A by the folding-based electrochemical aptasensor, *Anal. Chim. Acta.* 753 (2012) 27–31. doi:10.1016/j.aca.2012.09.036.
- [43] H. Kuang, W. Chen, D. Xu, L. Xu, Y. Zhu, L. Liu, Chu H, Peng C, Xu C, Zhu S., Fabricated aptamer-based electrochemical “signal-off” sensor of ochratoxin A, *Biosens. Bioelectron.* 26 (2010) 710–716.
- [44] G. Evtugyn, A. Porfireva, V. Stepanova, M. Kutyreva, A. Gataulina, N. Ulakhovich, V. Evtugyn, T. Hianik, Impedimetric aptasensor for ochratoxin A determination based on Au nanoparticles stabilized with hyper-branched polymer, *Sensors.* 13 (2013) 16129–16145.
- [45] L. Jiang, J. Qian, X. Yang, Y. Yan, Q. Liu, K. Wang, Wang K, Amplified impedimetric aptasensor based on gold nanoparticles covalently bound graphene sheet for the picomolar detection of ochratoxin A, *Anal. Chim. Acta.* 806 (2014) 128–135.
- [46] R.K. Mishra, A. Hayat, G. Catanante, C. Ocaña, J.-L. Marty, A label free aptasensor for Ochratoxin A detection in cocoa beans: An application to chocolate industries, *Anal. Chim. Acta.* 889 (2015) 106–112.
- [47] L. Rivas, C.C. Mayorga-Martínez, D. Quesada-González, A. Zamora-Gálvez, A. de la Escosura-Muñiz, A. Merkoçi, Label-free impedimetric aptasensor for ochratoxin-A detection using iridium oxide nanoparticles, *Anal. Chem.* 87 (2015) 5167–5172.
- [48] J. Qian, L. Jiang, X. Yang, Y. Yan, H. Mao, K. Wang, Highly sensitive impedimetric aptasensor based on covalent binding of gold nanoparticles on reduced graphene oxide with good dispersity and high density, *The Analyst.* 139 (2014) 5587–5593.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

L'objectif général de ce travail était de développer un nouveau biocapteur enzymatique ultrasensible pour la détection conductimétrique de l'ochratoxine A (OTA) dans l'huile d'olive. A travers cette étude, nous nous sommes intéressés à toutes les étapes de fabrication du biocapteur du choix de l'enzyme à l'application à l'analyse d'échantillons réels.

Dans un premier temps, l'état de l'art nous a permis de contextualiser notre problématique vis-à-vis des recherches actuelles et de souligner les différents types de biorécepteurs les plus utilisés pour la réalisation des biocapteurs. L'originalité du travail réalisé réside dans le choix d'enzymes comme éléments de biorecognition. Ces enzymes sont des peptidases : la carboxypeptidase Y (CPY) et la thermolysine (TLN). Le type de transducteur et la méthode de détection utilisés ont été aussi soigneusement sélectionnés. La géométrie particulière et la nature du matériau des microélectrodes interdigitées confèrent une meilleure efficacité de détection tandis que la conductimétrie permet le suivi direct de la réaction enzymatique par la mesure de la variation de conductivité induite par la production d'espèces chargées. Deux modes d'immobilisation des enzymes sur les électrodes ont été envisagés et comparés : la co-réticulation de l'enzyme avec la BSA à l'aide de vapeurs de glutaraldéhyde et le piégeage dans une matrice composite à base de polymères, l'alcool polyvinylique (PVA) et le polyéthylèneimine (PEI), et de nanoparticules d'or (AuNPs).

Nous avons tout d'abord montré l'importance du contrôle des différents paramètres de la fabrication et de la mesure du biocapteur tels que le choix des conditions de réticulation, le pH et la température. Tous ces facteurs jouent un rôle primordial sur les performances du

dispositif développé en particulier sur sa sensibilité et sa stabilité. Nous avons ainsi constaté qu'indépendamment de l'enzyme immobilisée, la CPY ou bien la TLN, un temps de réticulation de 35 min garantit une activité optimale. Des temps de réticulation trop faibles conduisent à la formation d'un réseau polymérique insuffisamment dense et provoquent le relargage de l'enzyme. Au contraire, des temps longs sont à l'origine de changements de conformation de l'enzyme et de son inactivation. De plus nous avons montré que les mesures conductimétriques doivent être effectuées à pH 7 et à une température de 25 °C. Opérer à des conditions différentes entraîne une diminution, voire une perte totale du signal. Nous n'avons, par ailleurs, constaté que l'immobilisation des enzymes conduit à un décalage et/ou un élargissement de la gamme de pH optimal, et à une modification de la stabilité thermique de l'enzyme. Les deux biocapteurs préparés par réticulation de l'enzyme à la surface de l'électrode en présence de BSA (biocapteurs CPY/BSA et TLN/BSA), présentent des performances analytiques comparables. Les réponses sont linéaires jusqu'à 75 μM et les limites de détection sont également très similaires (1 μM pour le biocapteur CPY/BSA et 0,7 μM pour le biocapteur TLN/BSA). Le comportement des deux enzymes est michaëlien, les paramètres cinétiques K_M^{app} et V_{max}^{app} étant de 26 μM et 3,3 $\mu\text{S}\cdot\text{min}^{-1}$ pour la TLN immobilisée, comme pour la CPY. Ces valeurs sont inférieures à celles rapportées dans la littérature pour d'autres hydrolases libres, telles que la chymotrypsine ou la carboxypeptidase A (CPA). Cela pourrait indiquer que les deux enzymes, une fois réticulées, possèdent une affinité apparente plus grande pour l'OTA que leurs analogues libres. Des temps de réponses relativement courts ont été observés pour les deux biocapteurs avec une valeur maximale de 25 min obtenue pour 150 μM d'OTA. Dans la gamme linéaire, les concentrations en OTA pourraient être obtenues en moins de 20 min. Le signal des biocapteurs est reproductible, les coefficients de variation calculés à partir de trois mesures consécutives effectuées à chaque niveau de concentration dans la gamme étudiée (5-150 μM) avec le même capteur sont inférieurs à 5%. Les signaux sont également très stables sur une période de 30 jours lorsque les biocapteurs sont stockés à 4 °C dans un tampon phosphate 20 mM.

Compte tenu de leurs activités spécifiques similaires et du faible coût de la TLN commerciale par rapport à celui de la CPY, la TLN a finalement été sélectionnée comme élément de reconnaissance.

Nous avons ensuite cherché à améliorer les performances du biocapteur à base de TLN. Nous avons tout d'abord évalué une méthode de pré-concentration de l'échantillon d'huile d'olive par extraction liquide-liquide. Le facteur de pré-concentration obtenu reste cependant modeste par rapport à l'objectif visé (gain d'un facteur 7000 en limite de détection) et l'introduction d'une étape d'extraction alourdit fortement le processus d'analyse. Nous avons donc essayé d'atteindre l'objectif visé d'une autre manière, à savoir par amélioration du fonctionnement de l'interface biologique et de la transduction. Ceci a pu être réalisé par utilisation d'une nouvelle méthode d'immobilisation de l'enzyme au sein d'une matrice polymérique de PVA/PEI et en présence de nanoparticules d'or (AuNPs). Les interactions entre les groupements amines protonés du PEI et les charges négatives de la TLN et des AuNPs citratées contribuent à l'amélioration de la dispersion de l'enzyme et des AuNPs dans le réseau polymérique, ce qui améliore la stabilité du biorécepteur et l'accessibilité du substrat. L'ajout des nanoparticules d'or améliore le transfert de charge des électrons et la

résistance de polarisation R_p , mesurée par spectroscopie d'impédance électrochimique, augmente en fonction de la concentration en OTA. Cette augmentation est liée à l'adsorption des produits de la réaction enzymatique au niveau de l'interface électrode/électrolyte.

Dans les conditions optimales de réticulation et de mesure, identiques à celles déterminées pour le biocapteur TLN/BSA, la réponse du biocapteur est linéaire jusqu'à 60 nM d'OTA, avec une sensibilité de $597 \mu\text{S} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ et une limite de détection de 1 nM, soit 700 fois plus faible que la limite de détection précédemment obtenue pour le biocapteur TLN/BSA. Aucun signal n'a été observé après l'injection d'OTA en absence des AuNPs. Ce résultat est en accord avec les propriétés isolantes du film hydrogel réticulé (PVA/PEI) à la surface de l'électrode démontrées par voltammétrie cyclique. L'incorporation des AuNPs dans la biomembrane TLN/BSA améliore la sensibilité d'un facteur 5,3 mais elle reste 140 fois plus faible que celle du biocapteur AuNPs/(PVA/PEI)/TLN. Les temps de réponse sont plus longs que ceux observés pour le biocapteur TLN/BSA, avec une valeur maximale de 48 min atteinte pour environ 200 nM en OTA. Ces différences peuvent être attribuées au phénomène de diffusion à travers les pores de la matrice polymérique. Le biocapteur proposé est stable sur une période de 30 jours et également reproductible avec des coefficients de variation de 3 à 15% dans la gamme de concentration d'OTA étudiée (2-200 nM). Des taux de recouvrement proches de 100% ont par ailleurs été obtenus pour la quantification de l'OTA dans des échantillons d'huile d'olive dopées

Le biocapteur développé paraît moins sensible que certains aptacapteurs cités dans la littérature. Néanmoins, sa limite de détection est proche de la plupart des immunocapteurs récemment développés et des deux seuls biocapteurs enzymatiques rapportés dans la littérature. De plus, il offre les avantages d'être plus simple et robuste, de s'appuyer sur la détection directe de l'OTA et d'être facilement régénérable en milieu aqueux. La facilité d'exécution du test, le faible coût du système proposé et les performances analytiques obtenues démontrent le fort potentiel de cette méthode pour la détection rapide de l'OTA dans les huiles végétales. Des études supplémentaires doivent être néanmoins réalisées afin d'atteindre des limites de détection encore plus basses, permettant d'envisager la détection de l'OTA dans des huiles faiblement contaminées, mais également dans des extraits d'autres matrices alimentaires pour lesquels la teneur maximale en OTA fait déjà l'objet de réglementation. Il sera également intéressant d'étudier la spécificité du biocapteur vis-à-vis d'autres membres de la famille des ochratoxines et de valider la méthode par comparaison avec une méthode de référence (HPLC).

LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

PUBLICATIONS

Dridi, F., Marrakchi, M., Gargouri, M., Garcia-Cruz, A., Dzyadevych, S., Vocanson, F., Saulnier, J., Jaffrezic-Renault, N., Lagarde, F., 2015. Thermolysin entrapped in a gold nanoparticles/polymer composite for direct and sensitive conductometric biosensing of ochratoxin A in olive oil. *Sens. Actuators B Chem.* 221, 480–490. doi:10.1016/j.snb.2015.06.120.

F. Dridi, M. Marrakchi, M. Gargouri, J. Saulnier, N. Jaffrezic-Renault, F. Lagarde, Comparison of carboxypeptidase Y and thermolysin for ochratoxin A electrochemical biosensing, *Anal. Methods.* (2015). doi:10.1039/C5AY01905B.

COMMUNICATIONS ORALES

GFB (Groupe Français de Bio électrochimie), Sète, France. 22-25 septembre 2014. Communication orale « Biocapteur impédimétrique à base de thermolysine immobilisée dans un matériau hybride nanoparticules d'or/polyéthylèneimine/alcool polyvinylique pour la détection de l'ochratoxine A »

Biosensors For Food Safety And Environmental Monitoring, Erfoud-Morocco- 19th – 21st november, 2015 « Thermolysin entrapped in a gold nanoparticles/polymer composite for direct and sensitive conductometric biosensing of ochratoxin A in olive oil »

POSTER

MADICA (Matériaux et Applications aux Dispositifs et Capteurs), Sousse, Tunisie. 7-9 novembre 2012: « Biocapteur enzymatique pour la détermination de l'ochratoxine A dans des produits agroalimentaires ».

JRAB (Journée Rhône-Alpes des Biomolécules), Lyon, France. 7 juin 2013. « Réticulation de la thermolysine sur la surface de micro transducteurs pour la détection de l'ochratoxine A ».

JE (Journées d'Electrochimie), Paris, France. 8-12 juillet 2013. Poster « Développement d'un nouveau biocapteur enzymatique pour la détection de l'ochratoxine A ».

MADICA (Matériaux et Applications aux Dispositifs et Capteurs), Mahdia, Tunisie. 7-9 novembre 2014. Poster « Caractérisation électrochimique des propriétés conductrices d'hybrides nanoparticules d'or/polyéthylèneimine/alcool polyvinylique/thermolysine. Application au développement d'un biocapteur enzymatique ».